

公表特許公報 (A)

平5-502228

⑤Int. Cl. ⁵ C 07 K 7/08	識別記号 ZNA	府内整理番号 8318-4H 7236-4B 8828-4B	審査請求 予備審査請求 有 5/00 15/00	未請求	部門(区分) 3 (2) B C※
---------------------------------------	-------------	---	--------------------------------------	-----	----------------------------

(全 19 頁)

⑥発明の名称 インテグリンーリガンド結合を阻害するペプチドおよび抗体

⑦特 願 平3-501552

⑧⑨出 願 平2(1990)11月29日

⑩公表 平成5年(1993)4月22日

⑪翻訳文提出日 平4(1992)6月1日

⑫国際出願 PCT/US90/06954

⑬国際公開番号 WO91/07977

⑭国際公開日 平3(1991)6月13日

優先権主張 ⑮1989年12月1日 ⑯米国(US)⑰444,777

⑦発明者 ブラウ エドワード エフ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイエゴ ラ ウス 4359

⑧出願人 スクリップス クリニツク ア アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92037 ラ ジョラ ノース ンド リサーチ ファウンデー トリー バインス ロード 10666 シヨン

⑨代理人 弁理士 中村 稔 外7名

⑩指定期 A T(広域特許), A U, B E(広域特許), C A, C H(広域特許), D E(広域特許), D K, D K(広域特許), E S, E S(広域特許), F I, F R(広域特許), G B(広域特許), G R(広域特許), I T(広域特許), J P, L U(広域特許), N L(広域特許), N O, S E(広域特許)

最終頁に統く

請求の範囲

1. 配列式：-TDVNGDGRHDL-で表されるアミノ酸残基配列を含む第1図に示したGP II bの配列に対応する配列を有する多くとも30アミノ酸残基長のポリペプチドで、血小板の凝集を阻害しうるポリペプチド。

2. 配列式：

```
TDVNGDGRHDL,  
AVTDVNGDGRHDLVGVAPLYM,  
AATDINGDDYADLFIGAPLFM,  
CSVDVVKDTITDVLLVGAPMYM,  
CAVDLNADGFS DLLVGAPMQS,  
AATDVGNGDGL DLLVGAPLLM,  
CGVDVGDGETELLLIGAPLFY,  
CSVDVDSNGSTDVLVIGAPHYY, または  
CSVDVDTDGSTDVLVIGAPHYY.
```

で表されるアミノ酸残基配列を有するポリペプチド。

3. 請求の範囲第2項記載のポリペプチドをコードする構造遺伝子を規定する配列を含む多くとも約2000スクレオチド塩基対を含むスクレオチドセグメント。

4. 請求の範囲第2項記載のポリペプチドと免疫反応するが、インテグリンベタサブユニットまたは基本的に以下の配列式：

```
YELHNNGPGTVNGLHL,  
YELRNNGPSSFSKAML,  
LKVTGSGVPVSMATV,  
TFHVINTGNNSMAPNVSV,  
YELLNQCPSSISQGVL,  
YQVRIQPSIHHDVPII,  
YQVSNLQLQRSLPISL, または  
YQVNNNLQCRDLPVSI.
```

で表される配列に対応する配列から本質的になるアミノ酸残基配列を有するポリペプチドとは免疫反応しない抗体分子を含むポリクローナル抗体組成物。

5. (a) GP II b、および(b) 配列式：AVTDVNGDGRHDLVGVAPLYM で表されるポリペプチドと免疫反応するモノクローナル抗体。

6. (a) 請求の範囲第2項記載のポリペプチド、および(b) 該ポリペプチドのアミノ酸残基配列が対応するインテグリンのアルファサブユニットと免疫反応するモノクローナル抗体。

7. 治療有効量の請求の範囲第1項記載のポリペプチドを患者に投与することを含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

8. 治療有効量の請求の範囲第2項記載のポリペプチドを患者に投与することを含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

9. 治療有効量の請求の範囲第4項記載のポリクローナル抗体組成物を患者に投与することを含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

10. 治療有効量の請求の範囲第5項記載のモノクローナル抗体を患者に投与することを含む該患者の血小板粘着を調節する方法。

11. 治療有効量の請求の範囲第6項記載のモノクローナル抗体を患者に投与することを含む該患者の細胞粘着を調節する方法。

12. 基質に固定化したとき細胞粘着を促進する能力を有する以下の配列式：

```
TDVNGDGRHDL,  
AVTDVNGDGRHDLVGVAPLYM,  
AATDINGDDYADLFIGAPLFM,  
CSVDVVKDTITDVLLVGAPMYM,  
CAVDLNADGFS DLLVGAPMQS,  
AATDVGNGDGL DLLVGAPLLM,  
CGVDVGDGETELLLIGAPLFY,  
CSVDVDSNGSTDVLVIGAPHYY, または  
CSVDVDTDGSTDVLVIGAPHYY.
```

で表されるアミノ酸残基配列を有するポリペプチドを含む組成物で、基質に固定化したとき基質に対する細胞粘着を促進する組成物。

13. 基質に固定化したとき細胞粘着を促進する能力を有する以下の配列式：

TDVNGDGRHDL で表されるアミノ酸残基配列を含み第1図に示されるGP II bの配列に対応する配列を有する多くとも30アミノ酸残基長のポリペプチドを含

明
否インテグリン-リガンド結合を阻害するペプチドおよび抗体関連出願の相互参照

本件出願は、1989年12月1日出願の継続中の出願継続番号444,777（参考として引用する）の一部継続出願である。

発明の分野

本発明は、インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域由来のポリペプチドおよびインテグリン-リガンド結合を調節することを目的とした該ポリペプチドの使用に関する。また、本発明は、インテグリンアルファサブユニットと免疫反応する抗体およびインテグリン-リガンド結合の調節または検出、またはインテグリン内のリガンド結合部位の検出を目的とした該抗体の使用に関する。

関連技術

一般に、細胞粘着は細胞の表面レセプターによる特異的粘着蛋白質の認識に関する。本発明で特に興味深い細胞表面レセプターはインテグリンである。

ハイネス(Hynes)、Cell, 48:549-554(1987)によると、インテグリンは細胞外マトリクス糖蛋白質、補体および他の細胞を含む幅広いリガンドと相互作用を起こす機能的にも構造的にも関連するレセプター群である。インテグリンは、胚の発生、止血、血栓症、傷の治療、免疫および非免疫防御メカニズムおよびガン遺伝子トランスポーメーションを含む多くの生理学的に重要なプロセスにおける細胞-マトリクスおよび細胞-細胞粘着に関係する。

少なくとも、2つのヒトの遺伝病、グラムマン血小板無力症および白血球粘着欠損症には、インテグリン群のメンバーが関連している。

構造的に、インテグリンは非共有結合的に会合するアルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマー複合体である。インテグリン群の中には、同じベータサブユニットの存在で関係付けられているサブファミリーがあり、各グループ内のメンバーはアルファサブユニットの違いで区別される。

例えば、最近、GP IIb-IIIaとして知られている血小板の表面に存在するインテグリンは、アルファサブユニットは異なるが、同じベータサブユニットおよ

びトリペプチドアミノ酸残基配列 Arg-Gly-Asp (1文字記号でRGD)

を認識する機能を有する粘着レセプターの内の一であることが示された。ビテラ(Pyteira)等、Science, 231:1559-1562(1986)およびルースローチ(Ruoslahti)等、Cell, 44:517-518(1986)。GP IIb-IIIaに加えて、この関連レセプターグループには、ビントロネクチンレセプター(VnR)およびオステオザルコマ細胞から単離したフィプロネクチンが含まれる。ビテラ(Pyteira)等、Cell, 40:191-198(1985)およびビテラ(Pyteira)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:5766-5770(1985)。

これらの蛋白質の機能、構造および抗原性の類似により、GP IIb-IIIaおよびVnRが、“サイトアドヘシソ”という名称が提唱されているインテグリンサブファミリーのメンバーであることが報告されている。プロウ(Plow)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6002-6006(1986)。サイトアドヘシソ群では、異なるアルファサブユニットと共通もしくは非常に類似するベータサブユニットが組み合わさっており、機能的に異なるレセプターを形成している。ギンスバーグ(Ginsberg)等、J. Biol. Chem. 262:5437-5440(1987)。

例えば、GP IIb-IIIaは、アルファおよびベータサブユニットからなるヘテロダイマー複合体である。ジェニシングス(Jennings)等、J. Biol. Chem. 257:10458-10466(1982)。アルファサブユニット、GP IIbには、互いにジスルフィド結合で結合する重鎖および軽鎖が含まれる。ベータサブユニット、GP IIIaは、約100kDaの一本鎖ポリペプチドである。フィリップス(Phillips)等、J. Biol. Chem. 252:2121-2126(1977)。免疫学的にGP IIb-IIIaに関連する細胞表面分子が、様々な細胞型で同定されている。チアガラジョン(Thiagarajan)等、J. Clin. Invest., 75:986-991(1985); プロウ(Plow)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6002-6006(1986); およびフィツジエラルド(Fitzgerald)等、J. Biol. Chem. 260:10893-10896

(1985)。

GP IIb-IIIaは、RGD含有蛋白質、すなわちフィブリノーゲン(バネット(Bannet))等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:2417-2421(1983)、フィブロネクチン(ギンスバーグ(Ginsberg)等、J. Clin. Invest., 71:619-624(1983))、およびフォン・ヴィルブランド因子(ルゲリ(Ruggeri)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6038-6041(1982))等Arg-Gly-Aspアミノ酸残基配列を含み、従て共通する血小板粘着蛋白質レセプターの成分である蛋白質との相互作用を通して血小板の機能に寄与している(ビテラ(Pyteira)等、Science, 231:1559-1562(1986)およびプロウ(Plow)等、J. Biol. Chem. 259:5388-5391(1984))。

共通のベータサブユニットが異なるアルファサブユニットと結合するヘテロダイマーが、少なくともあと2グループ同定されている。1つのグループは、白血球上に存在し白血球粘着(LieCam)群と呼ばれており、LFA-1, Mac-1およびP150, 95等が含まれる。サンチエス・マドリッド(Sanchez Madrid)等、J. Exp. Med., 158:1785-1803(1983)およびスプリングラー(Springer)等、Ciba Found. Symp., 118:102-126(1986)。もう1つのグループはより広く分布しており、VLAファミリーと呼ばれている。ヘムラー(Hemler)等、J. Biol. Chem. 262:3300-3309(1987)。チキンのVLAファミリーのベータサブユニット(ヘムラー(Hemler)等、J. Biol. Chem. 262:3300-3309(1987))がクローニングされ、シーケンシングされて“インテグリン”と命名された(タムクン(Tamkun)等、Cell, 46:271-282(1986))。チキンインテグリンの配列は、GP IIIa(フィッツジェラルド(Fitzgerald)等、J. Biol. Chem. 252:3936-3939(1987))および白血球粘着ファミリーのベータサブユニット(キシモト(Kishimoto)等、Cell, 48:681-690(1987))の配列と同じである。さらに、

幾つかのアルファサブユニットの部分配列も相同性を示す。ギンスバーグ (Ginsberg) 等、J. Biol. Chem. 262: 5437-5440 (1987); スズキ (Suzuki) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8614-8618 (1986); およびチャロ (Charo) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 8351-8356 (1986)。

現在、粘着レセプターとしての機能に重要なGP II b-III aまたは他のサイトアドヘシソ上の部位については良く分かっていない。幾つかの観察によって、GP II b-III a上の機能的に重要な部位はモノクローナル抗体PM I-1によって限定されるエピトープの付近にあることが示されている。この抗体はGP II bの重鎮に結合し (シャドル (Shadoll) 等、J. Cell. Biol. 99: 2056-2060 (1984))、幾つかの異なる機能活性に関連するGP II b上の領域を限定する。例えば、PM I-1は、洗浄した血小板のコラーゲンへの粘着を阻害する。シャドル (Shadoll) 等、J. Cell. Biol. 99: 2056-2060 (1984)。

最近、フィブリノーゲンのRGD含有領域との相互作用に関するGP III a上の部位が、GP III aと合成ペプチドKYGRGDSとの化学的架構により残基109-171の範囲にあることが示された。ドソザ (D' Souza) 等、Science. 242: 91-93 (1988)。フィブリノーゲンガム鎖ボリペプチドとGP II b-III aとの相互作用部位の同定の研究で、GP II bサブユニットと相互作用が示された。クロクゼウイック (Kloczewick), M. 等、J. Biochem. 23: 1767-74 (1984)。最近になって、フィブリノーゲンのガム鎖を含むペプチドがGP II bの同定可能な領域、残基294-314に選択的に架橋された。ドソザ (D' Souza) 等、J. Biol. Chem. 256: 3440-46 (1990)。これらの結果は、GP II b-III aのリガンド結合部位と294-314残基領域が近い関係にあることを示している。

発明の概要

インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合に関与する領域が始めて同

定された。さらに、血小板レセプターGP II b-III aのフィブリノーゲンへの特異的結合に関与するGP II b-III aの領域が始めて同定された。

本発明は、インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域の一部に実質的に相同的なアミノ酸配列を有することを特徴とする長さ約10乃至約100アミノ酸残基のポリペプチド (以後、本ポリペプチドと呼ぶ) に関する。

また、本発明は、本ポリペプチド並びにインテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域により形成されるエピトープと免疫反応するモノクローナル抗体および本ポリペプチドと免疫反応するポリクローナルおよびモノクローナル抗体に関する。これらの抗体はフィブリノーゲンの血小板への結合を調節するのに有用である。

また、本発明は、前記モノクローナル抗体を生産しうるハイブリドーマに関する。

また、本発明は、本ポリペプチドに相当するインテグリンアルファサブユニットを発現する細胞の、インビオでの粘着を調節する方法に関する。本方法において、細胞粘着は本発明のポリペプチドまたは抗ポリペプチド抗体を使用して調節される。このようにして、血小板凝集およびフィブリノーゲンへの血小板の結合が阻害される。

さらに、本発明は、本ポリペプチドをコードする構造遺伝子を限定する配列を含む約12,000ヌクレオチド塩基対のヌクレオチドセグメントに関する。また、本発明は、本ポリペプチドをコードする構造遺伝子を限定するDNAセグメントに機能的に結合するベクターを含む組み換えDNA分子に関する。

図面の簡単な説明

図面も本公開の一部である。

第1図はGP II bのアルファサブユニットをコードするDNAセグメントのヌクレオチド塩基配列および説明されるアミノ酸残基配列を示している。アミノ酸残基は1文字コードで示されており、右の余白に番号付けされている。ここでは、最初の-31のメチオニン (M) から始まっているが、31個のアミノ酸残基リードー配列が除かれた後の蛋白質は最初の+1のロイシン (L) から始まることが示されている。従って、GP II bアルファサブユニットはリードー配列切断前

に1039残基を含んでおり、アミノ末端からのリードーの切断後は1008残基を含んでいる。核酸塩基残基は1文字コードで示されており、左余白に番号付けしてある。ここに示した配列は、ポンクズ (Poncz) 等、J. Biol. Chem. 262: 8276-82 (1987) に報告されているGP II bの配列から引用した。

パネル1-1乃至1-9は、1-3172のGP II bヌクレオチド塩基配列および-31-1008に対応するアミノ酸残基配列を示している。

第2図は、インテグリン粘着レセプターのアルファサブユニット (GP II b) 中の種々の部位にガム鎖ペプチド (K16) を架橋させた結果を示している。¹²⁵I-ラベル化ペプチドK16 (30 μM) を22°C、4.5分間で血小板 (6 × 10⁶/ml) に結合させ、実施例1Bに従ってBS³ (0.2 mM) で架橋した。架橋サンプルは、実施例1Bおよび1Cに示したようにSDS-PAGE (レムリ (Laemmli). Nature. 227: 680 (1970)) およびオートラジオグラフィーで分析した。

パネルAは、ペプチドインヒビターの非存在下 (左レーン) または架橋特異性のコントロールとして50倍モル過剰の非ラベル化K16ペプチドの存在下 (右レーン) でのトロンビン刺激化血小板への¹²⁵I-K16の架橋の結果を示している。

パネルBは、GP II b重鎮特異的抗体、PM I-1を用いた免疫沈澱後の架橋サンプルのSDS-PAGE分析の結果を示している。

パネルCは、ADP (10 μM)、PMA (0.1 μM) またはトロンビン (0.5 ユニット/ml) の存在下 (レーン2-4) およびアゴニスト非存在下 (レーン1) で血小板を用いて調製した架橋サンプルのSDS-PAGE分析の結果を示している。

第3図は、実施例1Cに従い、K16がアルファサブユニット (GP II b) の重鎮部分の残基に架橋していることを示している。始めに、¹²⁵I-K16は血小板に架橋した。この架橋サンプルを非還元条件下 SDS-PAGE分析し、放射性バンドを切り出したのち、2-メルカプトエタノールの存在下、10-20%勾配SDS-PAGEゲルで再び分析した。このゲルを、GP II b重鎮 (レ

ーン1) またはGP II b軽鎮 (レーン2) と免疫反応する抗体を用い、実施例1Cに従ってイムノプロット分析した。レーン3および4は、非還元 (レーン3) または還元 (レーン4) 条件下、第2のゲルで分析した抽出サンプルのオートラジオグラムを示している。

第4図は、実施例1Dに従ったアルファサブユニット (GP II b) のアミノ末端領域におけるK16架橋部位の特定を示している。実施例1Dに従い、第3図に示した還元SDS-PAGEゲルから抽出したGP II b重鎮-K16複合体をキモトリプシンで消化し、GP II b重鎮特異的抗体、PM I-1を用いたイムノプロッティング (レーン1および2) またはオートラジオグラフィーにより再分析した。レーン1および3は未消化の抽出複合体を示し、レーン2および4はキモトリプシンによる消化後の抽出複合体を示している。矢印は検出された60 kDaのキモトリプシンフラグメントの位置を示している。

第5図は、実施例1Dに従ったGP II b重鎮内のK16架橋部位の特定を示している。GP II b-K16複合体を第3図で示したように還元SDS-PAGEゲルから単離し、CNBr、キモトリプシンまたはSV8プロテアーゼで消化した。その後、このサンプルをSDS-PAGEで分析し、オートラジオグラムを作成して放射性フラグメントを示した。元の (未消化) 複合体もコントロールとして分析した。次に、各消化物由来の放射性バンドを抽出し、第4図に示したようにアミノ末端をシーケンシングした。各消化物の配列を図中に示した。GP II b配列内のアミノ酸残基部位も各フラグメント配列の上に示した。この部位は第1図の位置に対応している。

第6図は、GP II b内のK16架橋部位を特定するために行った第3図-第5図に示されている分析の模式図である。¹³⁷Iアミノ酸残基を含むGP II b軽鎮および⁸⁷Sアミノ酸残基を含む重鎮をステップ1のスケールに書き込んである。第3図に示した結果は、軽鎮がK16ペプチドに架橋しないことを示している (ステップ1)。部分的キモトリプシン消化物へのGP II b特異的抗体PM I-1のイムノプロッティングにより、GP II b重鎮のアミノ末端側半分にK16の架橋部位が特定された (ステップ2)。GP II b: K16のCNBr消化由来する40 kDaフラグメントは、メチオニン残基314で終わっていると予測され

る(ステップ3)。GP II b : K I 6 のキモトリプシン消化では、残基294で始まる7 kDaのフラグメントが生成した(ステップ4)。GP II b : K I 6 のSV8由来の9 kDaフラグメントは、残基254で始まっていることが分かった(ステップ5)。従って、K I 6 架橋部位は、GP II b 重鎖上の残基294-314の21アミノ酸残基を含んでいる。この領域はボックスで囲み、ステップ1では矢印で示してある。

第7図。パネルAは、¹²⁵I-フィブリノーゲン結合の抗p1(B12)抗体濃度依存性を示している。p1ポリペプチド(黒丸)とGP II b-IIIa(三角)をマイクロプレートに固定化した。この結果は、フィブリノーゲン結合の抗p1抗体による選択的阻害を示している。パネルBは、¹²⁵I-フィブリノーゲンの血小板への結合の抗p1抗体存在下における選択的阻害を示している。

発明の詳細な説明

A. 定義

アミノ酸残基：本明細書で使用しているアミノ酸残基は、“L”型であることが好ましい。しかし、ポリペプチドの機能が維持されるならば、“D”型アミノ酸残基を“D”型アミノ酸残基に置換することもできる。NH₂は、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離したアミノ基を示している。COOHは、ポリペプチドのカルボキシ末端に存在する遊離したカルボキシル基を示している。標準的ポリペプチド命名法に準拠し、J. Biol. Chem., 243:3557-59(1969)、アミノ酸残基の略号は、以下の対応表に示したものを使用した。

対応表

記号		アミノ酸
1文字	3文字	
Y	Tyr	チロシン
G	Gly	グリシン
F	Phe	フェニルアラニン
M	Met	メチオニン
A	Ala	アラニン
S	Ser	セリン
I	Ile	イソロイシン
L	Leu	ロイシン
T	Thr	スレオニン
V	Val	バリン
P	Pro	プロリン
K	Lys	リジン
H	His	ヒスチジン
Q	Gln	グルタミン
E	Glu	グルタミン酸
W	Trp	トリプトファン
R	Arg	アルギニン
D	Asp	アスパラギン酸
N	Asn	アスパラギン
C	Cys	システイン

すべてのアミノ酸残基配列は、左から右へアミノ末端からカルボキシ末端の方向に表されている。さらに、アミノ酸残基配列の始め、または終わりのダッシュは、一つ以上のアミノ酸残基の配列、またはアミノ末端NH₂基またはカルボキシ末端COOH基へのペプチド結合を示している。

ポリペプチドおよびペプチド：本明細書で使用しているポリペプチドおよびペプチドという言葉は、調合う残基のアルファーアミノ基およびカルボキシ基間のペプチド結合で互いに連結される一連の約100アミノ酸残基を示す。

ヌクレオシドおよびヌクレオチド：糖部分(ペントース)、リン酸および窒素へテロ環塩基からなるDNAまたはRNAのモノマー単位。塩基はグリコシド炭素(ペントースの1'炭素)を介して糖部分に結合しており、塩基と糖を合わせてヌクレオシドという。ヌクレオシドが、そのペントースの3'または5'位置に結合するリン酸基を有するとき、ヌクレオチドと呼ばれる。

塩基対(bp)：二本鎖DNA分子中のアデニン(A)とチミン(T)、またはシトシン(C)とゲアニン(G)の水素結合パートナーの組み合わせ。

レセプター：本明細書で使用するレセプターおよびレセプター蛋白質という言葉は、リガンドと呼ばれる別の分子に特異的に結合しレセプター-リガンド蛋白質複合体を形成する生物学的に活性な蛋白質性分子を示す。

リガンド：リガンドとは、特定のレセプター蛋白質と特異的相互作用により結合する構造部分を含む分子のことである。代表的なリガンドおよびレセプターには、フィブリノーゲンおよび血小板糖蛋白質GP II b-III aがある。

B. ポリペプチド

本発明のポリペプチドは、少なくとも約10、多くて約100、好ましくは多くとも40、より好ましくは多くとも約25-30個のアミノ酸残基を含む。さらに、本ポリペプチドは第1図に示した残基290-320間のGP II bのフィブリノーゲン結合領域の一部分の、すなわちその領域と同じ機能領域に由来する部分と相同的なアミノ酸残基配列を有する特徴を持っている。

本明細書において、GP II bのフィブリノーゲン結合領域と相同的であるということは、GP II bの残基290-320の領域のように表しで同定されているインテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域由来の配列、または、ビトロネクチンレセプター(VnR), VLA-2, VLA-4, VLA-5, LFA-1およびMac-1を含むインテグリンのアルファサブユニットのリガンド結合領域上に存在する相同的配列を有するポリペプチドに限定して使用される。

表1に示されているように、インテグリンアルファサブユニットの同定された全てのリガンド結合領域由来のアミノ酸配列は、相同意G P II b配列と45%以上の類似性(相同性)を有している。

ある想様の本ポリペプチドは、配列式:-TDVNGDGRHDL-で表されるアミノ酸残基配列を含む第1図に示したGP II bの配列に対応する配列を含み、GP II bとフィブリノーゲンなどのその本来のリガンドとの相互作用を阻害しうる。

インテグリンに関する事項で使用している本来のリガンドとは、インテグリンが通常の細胞相互作用プロセスで結合する天然の蛋白質、即ちその各々のリガンドを意味する。例えば、GP II b-III aの本来のリガンドはフィブリノーゲンであり、ビトロネクチンレセプターの本来のリガンドはビトロネクチンであり、フィブロネクチンレセプターの本来のリガンドはフィブロネクチンである。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式:-TDINGDDYADV-で表されるアミノ酸残基配列を含むVnRの配列に対応する配列を有し、VnRとその本来のリガンドとの相互作用を阻害し、細胞表面にVnRを含む細胞の粘着を阻害しうる。VnRのアルファサブユニットの全配列は、表位置の脚注で引用している文献に示されている。

表1

GP IIb-IIIaおよびインテグリン群の他のアルファサブユニットのリガンド結合領域

GP IIb-IIIa およびインテグリン群の他のアルファサブユニットのリガンド結合領域	リガンド結合領域のアミノ酸残基配列	K-16架橋領域に 対する相似性(%)	金GP IIb配列に 対する相似性(%)
		GP IIb配列に 対する相似性(%)	
GP IIb	AVTDVNGDGRHDL-LVGAPLYW	36%	36%
VnR	AATDINGDDYADLFIGAPLFM	(51%)	(52%)
VLA-2	CSVVDVKDTITDVLLVGAPMYM	(52%)	(52%)
VLA-4	CAVDLNADGFSDL-LVGAPMS	(48%)	(48%)
VLA-5	AATDVGNGGDDL-LVGAPLM	(81%)	(81%)
LFA-1	CGVVDVGGTBTLLVLIGAPLY	(48%)	(48%)
Mac-1	CSVVDVDSNGSTDVLVIGAPHY	(48%)	(48%)
P150, 95	CSVVDVDTGSTDVLVIGAPHYY	(52%)	(52%)

GP IIbのリガンド結合領域のアミノ酸残基配列は、実施例1Dにおいてフィブリノーゲンへの結合に関するリガンド結合領域であるポリペプチドK-16への架橋により決定され、この配列は第1図に示したGP IIbの残基294-314に対応している。他のインテグリンアルファサブユニットに関して示されている配列は、以下の引用文献から入手した（対応するインテグリンを文献の最後に示した）。スズキ（Suzuki）等、J. Biol. Chem. 262:14080-85 (1987) (VnR)；タカダ（Takada）等、J. Cell. Biol., 109:397-407 (1989) (VLA-2)；タカダ（Takada）等、EMBO J., 8:1361-68 (1989) (VLA-4)；アーチレイブス（Argraves）等、J. Cell. Biol., 105:1183-90 (1987) (VLA-5)；ラーソン（Larson）等、J. Cell. Biol., 108:703-12 (1989) (LFA-1)；コルビ（Corbii）等、J. Biol. Chem. 263:12403-12411 (1988) (Mac-1)；およびコルビ（Corbii）等、EMBO J., 6:4023-28 (1987) (p150, 95)（これらは参考として引用している）。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDKDTITDV-で表されるアミノ酸残基配列を含むVLA-2の配列に対応する配列を有し、VLA-2とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にVLA-2を含む細胞の粘着を阻害しうる。VLA-2のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式：-VDLNADGFSDL-で表されるアミノ酸残基配列を含むVLA-4の配列に対応する配列を有し、VLA-4とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にVLA-4を含む細胞の粘着を阻害しうる。VLA-4のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式：-TDVNGDGLDDL-で表されるアミノ酸残基配列を含むVLA-5の配列に対応する配列を有し、VLA-5とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にVLA-5を含む細胞の粘着を阻害しうる。

細胞の粘着を阻害しうる。VLA-5のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVGDGETE-で表されるアミノ酸残基配列を含むLFA-1の配列に対応する配列を有し、LFA-1とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にLFA-1を含む細胞の粘着を阻害しうる。LFA-1のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDSNGSTD-で表されるアミノ酸残基配列を含むMac-1の配列に対応する配列を有し、Mac-1とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にMac-1を含む細胞の粘着を阻害しうる。Mac-1のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

別の想様の本ポリペプチドは、配列式：-VDVDTGSTD-で表されるアミノ酸残基配列を含むp150, 95の配列に対応する配列を有し、p150, 95とその本来のリガンドとの相互作用を阻害して細胞表面にp150, 95を含む細胞の粘着を阻害しうる。p150, 95のアルファサブユニットの全配列は、表1の脚注で引用している文献に示されている。

各インテグリンに対応するポリペプチドに関する上記想様の典型である好ましい想様は、表2に示した配列式に対応するか、好ましくは一致するアミノ酸残基配列を有するポリペプチドである。

表2

配列式の名称	アミノ酸残基配列
p1	TDVNGDGRHDL
p2	AVTDVNGDGRHDL-LVGAPLYM
p3	AATDINGDDYADLFIGAPLFM
p4	CSVVDVKDTITDVLLVGAPMYM
p5	CAVDLNADGFSDL-LVGAPMS
p6	AATDVGNGGDDL-LVGAPLM
p7	CGVVDVGGTBTLLVLIGAPLY
p8	CSVVDVDSNGSTDVLVIGAPHY
p9	CSVVDVDTGSTDVLVIGAPHYY

p1およびp2は、それぞれGP IIbに関して第1図に示した残基296-306、および残基294-314のアミノ酸残基配列に完全に一致する配列を有する。p3からp9は、それぞれインテグリン、VnR、VLA-2、VLA-4、VLA-5、LFA-1、Mac-1およびp150, 95のアルファサブユニットのリガンド結合領域に関して表1に示したアミノ酸残基配列と完全に一致する配列を有する。

さらに、好ましい想様の本ポリペプチドは、血小板の凝集、フィブロblastのマトリクスへの粘着などのインテグリン依存細胞粘着を競合的に阻害しうる特徴を有する。即ち、好ましい本ポリペプチドは、本来のリガンド、即ち該ポリペプチドが由来するインテグリンがインビボで結合するリガンドに対するインテグリンの結合を競合的に阻害しうる。

本ポリペプチドが、残基290と320の間のGP IIbのフィブリノーゲン結合領域由來のアミノ酸残基配列を含む場合、該ポリペプチドは血小板粘着を阻害する、即ち抗凝血剤として作用する能力を有する。特に好ましい血小板粘着阻害ポリペプチドは、上述のポリペプチドp1およびp2である。その粘着阻害性は実施例3で示される。

また、好ましい想様の本ポリペプチドは、さらに接種物として使用したときに本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の生産を誘導する特徴を有する。

上述の配列式に対応する配列に加えて、本ポリペプチド中に存在するアミノ酸残基は、本明細書に記載されているポリペプチドの基本的、かつ新しい特性に影響を与えないすべての残基とすることが出来る。通常、このような付加的残基は公開するペプチドの一端、または両端の付加され、また、公開するペプチド配列の反復および部分的反復、またはインテグリンアルファサブユニット蛋白質配列の連続する残基を含みうる。

本ポリペプチドは、インテグリンアルファサブユニット配列のリガンドの一部に対応するアミノ酸残基配列を有する。従って、本発明のポリペプチドは、上述の本ポリペプチドの好ましい特性の少なくとも1つを示しうるかぎり、インテグリンアルファサブユニットのリガンド結合部分のアミノ酸残基配列と同一である。

必要はない。従って、本ポリペプチドは、それらを使用する特定のメリットを提供する保存的または非保存的な挿入、欠失および置換など種々の変化を起こしうる。

保存的置換とは、特定のアミノ酸残基を別の生物学的に同じ残基で置き換えることである。保存的置換の例としては、イソロイシン、バリン、ロイシンまたはメチオニンなどの疏水性残基の別の疏水性による置換、またはアルギニンとリジン、グルタミン酸とスパラギン酸またはグルタミンとスパラギンなど、極性残基間の置換が含まれる。“保存的置換”には、そのポリペプチドが必要とされる結合性または接種活性を保持するならば、未置換の元のアミノ酸の代わりに置換したアミノ酸を使用することも含まれる。

本ポリペプチドが一つ以上の保存的または非保存的置換を行ったためにインテグリンアルファサブユニットの配列と異なる配列を有する場合、通常、多くとも約20%、より一般的には10%のアミノ酸残基が置換される。本発明のポリペプチドを簡単にラベルまたは固体マトリクス、または抗原キャリヤーに固定化しうるリンクマークを提供する目的でどちらかの末端に付加的残基を付加する例外がある。本発明のポリペプチドに使用しうるラベル、固体マトリクスおよびキャリヤーを以下に議論する。

通常、アミノ酸残基リンクマークは少なくとも1つ、場合によっては40以上の残基からなるが、一般的には1から10残基で構成される。リンクマークに使用する典型的アミノ酸残基には、チロシン、システイン、リジン、グルタミン酸およびスパラギン酸等が含まれる。代表的リンクマークは、実施例2に示したリンクマークのカルボキシ末端で本ポリペプチドのアミノ末端に結合するトリペプチドCys-Gly-Gly(CGG-)である。さらに、本発明のポリペプチド配列は、アセチル化等の末端-NH₂アシル化、またはチオグリコール酸アミド化、またはアンモニア、メチルアミン等の末端カルボキシルアミド化により変化することで天然の配列とは異なることがある。

リンクマークによってキャリヤーに結合することで当分野でキャリヤーハブテン結合体として知られているものを生成する場合、本ポリペプチドは、ポリペプチドのアミノ酸残基配列が対応するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応す

る抗体を誘導しうる。免疫学的交差反応の観点から、本発明は、表2に示した配列を有するポリペプチドに対応するアミノ酸残基配列を有するポリペプチドの抗原的に関連する変異体に関する。“抗原的に関連する変異体”とは、表2に示した配列式に従うポリペプチドによって誘導される抗体と免疫反応するポリペプチドである。

本ポリペプチドは、ポリペプチドの分野でよく知られている技術で合成しうる。使用しうる多くの技術に関する優れた総説には、固相法については、J. M. スチュワード(Steward)およびJ. D. ヤング(Young)、“固相ペプチド合成” W. H. フリーマン社版、サンフランシスコ、1969およびJ.マイエンホーファー(Meienhofer)、アカデミックプレス版(ニューヨーク)、1983、および、古典的液相法については、E. シュローダー(Schröder)およびK. クブケ(Kubke)、“ペプチド”第1巻、アカデミックプレス(ニューヨーク)、1965がある。

関連する態様には、基質への細胞の付着(粘着)を促進する組成物がある。本来のインテグリンのリガンドへの結合に関してインテグリンと競合する本ポリペプチドの能力に基づき、本ポリペプチドはリガンドの結合の媒体を提供し、該ポリペプチドを基質上に固定化して細胞付着活性の促進に使用することが出来る。

本ポリペプチドを含む組成物を使用して基質を処理し、基質上に該ポリペプチドを固定化できる。

基質とは、細胞粘着促進活性を必要とする全ての表面で、細胞培養容器、医療機械、補綴装置、合成樹脂織維、血管または血管移植植物、経皮装置、人工器官等が含まれる。この表面は、硝子、合成樹脂、ニトロセルロース、ポリエチル、アガロース、コラーゲンまたは、長鎖多糖類を含むことが出来る。

基質へのポリペプチドの固定化は種々の方法で行うことが出来るが、とりわけ基質や望まれる固定化メカニズムに依存する。ポリペプチドの固定化または結合方法は、当分野でよく知られているが、一般には基質上に存在する反応基とポリペプチドのチオール基またはアミノ基との共有結合が使用される。

例えば、ポリペプチドの固定化法は、オーラメス(Aurameas)等、Scand. J. Immunol., Vol. 8 Suppl. 7: 7-23 (1

978); U. S. Pat. Nos. 4,493,795, 4,578,079および4,671,950; クリップスタイン(Klipstein)等、J. Infect. Dis., 147: 318-326 (1983) およびリュウ(Liu)等、Biochem., 80: 690 (1979) 参照。細胞粘着促進ポリペプチドの使用について、例えばU. S. Pat. No. 4,578,079 参照。

C. 接種物

別の態様において、本発明のポリペプチド、好ましくは表2に示した配列式に応答するペプチドまたはその抗原的に関連する変異体を、医療的に許容可能な水性希釈液として使用して、有効量を投与したとき該ポリペプチドのアミノ酸残基配列が対応するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応する抗体を誘導しうる接種物を調製することが出来る。この様にして誘導した抗体はインテグリンリガンド相互作用を阻害しうる。

種々の文法型で使用される“接種物”という言葉は、インテグリンアルファサブユニットに対する抗体の調製に使用する活性成分として本発明のポリペプチドを含む組成物を示す。

ポリペプチドを使用して抗体を誘導する場合、そのポリペプチドは単独で、または結合体としてキャリヤーに結合して、またはポリペプチドポリマーとして使用しうるが、表現を簡単にするために本発明のポリペプチドの態様では、“ポリペプチド”およびその種々の文法型で統一して表していることを明記しておく。

既に述べたように、一つ以上の付加的アミノ酸残基をポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に付加して、ポリペプチドのキャリヤーへの結合を助けている。ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端に付加したシステイン残基は、ジスルフィド結合により結合体を形成させるのに特に有用であることが分かった。しかし、結合体を調製するのに当分野でよく知られている別の方法を用いることもできる。代表的な付加的結合操作にはミカエル付加反応産物、グルタルアルdehyd等のジアルdehyd、クリップスタイン(Klipstein)等、J. Infect. Dis., 147, 318-326 (1983) およびその他の物質の使用、またはキャリヤーへのアミド結合を生ずる水溶性カルボジイミ

ドの使用が含まれる。活性官能基を介した蛋白質の結合に関する総説としては、オーラメス(Aurameas)等、Scand. J. Immunol., Vol. 8, Suppl. 7: 7-23 (1978) 参照。

有用なキャリヤーは当分野でよく知られており、一般的には蛋白質である。このようなキャリヤーの例としては、キーホール リンベット ヘモシアニン(LH)、エデスチン、チログロブリン、ウシ血清アルブミン(BSA)またはヒト血清アルブミン(HSA)等のアルブミン、ヒツジ赤血球(SRBC)等の赤血球、破傷風トキソイド、コレラトキソイドおよびポリ(D-リジン:D-グルタミン酸)等のポリアミノ酸等がある。

キャリヤーの選択は接種物の最終的使用法に依存するが、本発明には特に関係しない基準に基づいています。例えば、接種する特定の動物において不都合な反応を起こさないキャリヤーを選択すべきである。

本接種物には、一般にキャリヤーと結合した結合物として有効な免疫原量の本発明のポリペプチドが含まれている。単位投与量当たりのポリペプチドまたは蛋白質の有効量は、当分野でよく知られているようにとりわけ接種する動物種、その動物の体重および選択された接種方法に依存する。一般に、接種物には、接種(投与)当たり約10マイクログラムから約500ミリグラム、好ましくは投与当たり約50マイクログラムから約50ミリグラムの範囲のポリペプチドまたは蛋白質が含まれる。

本発明の接種物に使用される“単位投与量”とは、必要な希釈剤なしわちキャリヤーまたはベヒクルと共に望ましい免疫原効果を上げるために計算された所定量の活性成分を含む、動物への单一の投与に適した物理的に分離した単位を示す。本発明の接種物の新しい単位投与量の明細は、本明細書で詳細に説明されており、本発明の特徴ともなっている(a)活性物質の特性および達成すべき特定の免疫効果、および(b)動物の免疫に使用するこれらの活性物質を調合する技術に内在する制限によって決定され、かつこれらに直接依存する。

一般に、接種物は、水、食塩水またはリン酸緩衝液などの生理学的に許容しうる希釈剤またはベヒクル中に乾燥固体状のポリペプチド結合体を分散させ水性組成物とすることにより調製する。これらの希釈剤は当分野でよく知られており、

例えば Remington's Pharmaceutical Sciences, 16編、マック パブリッシング カンパニー、イーストン、PA (1980), pp. 1465-1467 参照。

また、接種物は希釈剤の一部としてアジュバントを含むことが出来る。完全フロイントアジュバント (CFA)、不完全フロイントアジュバント (IFA) およびミョウバン等のアジュバントが知られており、いくつかの癌者から販売されている。

D. ポリクローナルおよびモノクローナル抗体

本発明の抗体は、本ポリペプチドに対応するアミノ酸残基配列によって限定されるエピトープドメインに存在するインテグリンアルファサブユニットのエピトープと免疫反応を起こす。好ましい態様において、抗体によって認識されるエピトープは、アルファサブユニットへの抗体の結合を競合的に阻害するポリペプチドの能力によって明らかのように本ポリペプチドにより形成されうる（免疫学的に真似る）ものである。

本ポリペプチドに対応するアミノ酸残基により限定されるエピトープドメインの一部を認識する本抗体の能力は、当分野でよく知られている方法で測定しうる。

種々の文法型で使用される“抗体”という言葉は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち、抗体結合部位バラトープを含む分子を意味する。代表的抗体分子には、本来の免疫グロブリン分子、実質的に本来の免疫グロブリン分子およびF(ab)、F(ab')、F(ab')₂、およびF(v)として当分野で知られているバラトープを含む免疫グロブリンの一部が含まれる。

“抗体結合部位”とは、抗原と特異的に結合する（免疫反応する）重鎖および軽鎖の可変および超可変部を含む抗体分子の構造部分である。種々の文法型の“免疫反応”という言葉は、抗原決定基含有分子と全抗体分子またはその一部分等の抗体結合部位を含む分子間の結合を意味する。

“抗原決定基”とは、抗体結合部位と免疫学的に結合する抗原の実質的な構造部分である。この言葉は、“エピトープ”と同義的に使用される。

1. ポリクローナル抗体

含む細胞の粘着を阻害し、これを調節するのに有用である。

ある態様の好ましいポリクローナル抗体は、GP II bと免疫反応し、GP II bのフィブリノーゲンを特異的に結合する能力を阻害しうることを特徴とする。

このように、GP II bのフィブリノーゲン結合領域由来の配列を有する本ポリペプチドと免疫反応する好ましいポリクローナル抗体は、血小板粘着、血小板凝集および血栓形成等のフィブリノーゲン-GP II b-III a リガンド-レセプター複合体依存の事象を阻害しうる。

一般に、本発明のポリクローナル抗体は、本発明の接種物、好ましくは表2に示した配列式に対応するペプチドを含む接種物で哺乳動物を免疫化し、適当なポリペプチド免疫特異性を有する哺乳動物抗体分子を誘導することにより調製する。ついで、この抗体分子を哺乳動物から回収し、例えば固相中の免疫化ポリペプチドを用いたイムノアフィニティークロマトグラフィー等の従来法により望ましい程度まで精製する。この様にして得たポリクローナル抗体は、とりわけ活性化および非活性化血小板または核形成細胞を区別する本発明の診断法および診断システム、および血小板粘着阻害などの細胞粘着の調節を目的とした治療法で使用しうる。

2. モノクローナル抗体

本発明のモノクローナル抗体は、GP II bの残基290-320に相同的なインテグリンアルファサブユニットのリガンド結合領域により形成されるエピトープと免疫反応することを特徴とする。さらに、本モノクローナル抗体は本ポリペプチド、好ましくは表2に示した配列式に対応するポリペプチドと免疫反応するという特徴を有することが望ましい。

また、好ましいモノクローナル抗体は、ポリクローナル抗体に関して述べたようにインテグリンのリガンドに対する特異的な結合を阻害する能力を有するという特徴を持つ。さらに、ポリペプチド1またはp2等、GP II bのフィブリノーゲン結合領域由来の本ポリペプチドと免疫反応する好ましいモノクローナル抗体は、GP II bの特異的にフィブリノーゲンを結合する能力を阻害し、血小板粘着を阻害しうる特徴を有する。

ある態様のモノクローナル抗体には、a) GP II b、およびb) 配列式：

さらに本ポリクローナル抗体は、~~いる~~ インテグリンベータサブユニットまたは本ポリペプチドのアミノ酸残基配列が対応するインテグリンアルファサブユニットのカルボキシ末端半分における配列と同じアミノ酸残基配列を有する抗原性ポリペプチドとも免疫反応を起さないという特徴を有している。従って、例えば本ポリクローナル抗体は表3に示した配列のポリペプチドとは免疫反応を起さない。

表3

インテグリンアルファサブユニットのカルボキシ末端半分に由来するポリペプチド

インテグリン	アミノ酸配列位置	アミノ酸残基配列
GPIIb	784-799	YELHNNGPGTVNGLHL
VnR	810-825	YELRNNGPSFSKAML
VLA-2	946-960	LKVTTGSVPVSMATV
VLA-4	775-791	TFHVINNTGNSMAPNVSV
VLA-5	830-845	YELINQGPSSISQGVSL
LFA-1	928-943	YQVRIQPSIHDKVIFT
Mac-1	940-954	YQVSNLGQRSLPISL
P150, 95	936-950	YQVNNLGQRDLPVSI

1 本ポリペプチドリストに含まれるアミノ酸残基配列および残基の位置番号は、表1の脚注で引用した参考文献から引用した。

本発明の好ましいポリクローナル抗体は、本ポリペプチド、好ましくは表2に示した配列式に対応するアミノ酸残基配列を有するポリペプチドと免疫反応する。

好ましいポリクローナル抗体は、インテグリンアルファサブユニットと免疫反応し、リガンド含有蛋白質との相互作用でリガンドに特異的に結合するインテグリンの能力を阻害しうることを特徴とする。このように、本ポリクローナル抗体は、インビボまたはインビトロにおいてこの抗体が免疫反応するインテグリンを

AVTDVNGDGRHDLLVGAPLYM

に対応するポリペプチドと免疫反応する抗体分子が含まれる。

関連する態様は、a) 以下の配列式：

```

TDVNGDGRHDLLVGAPLYM,
AVTDVNGDGRHDLLVGAPLYM,
AATDINGDDYADLFIGAPLIM,
CSVDVDOKDTTIDVLLVGAPYMM,
CAVDLNADGFSIDLVGAPMQS,
AATDVNGDGLDDLLVGAPLIM,
CGVDVGDGETELLIGAPLFY,
CSVDVDNSGSTDLVLIGAPHYY, または
CSVDVDTDGSTDLVLIGAPHYY;

```

に対応する配列を有するポリペプチド、およびb) 該ポリペプチドの35アミノ酸残基の配列と対応するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応するモノクローナル抗体分子を含むモノクローナル抗体に関する。

種々の文法型の“モノクローナル抗体”という語句は、特定の抗原と免疫反応しうる单一種の抗体結合部位を含む抗体分子群を示す。一般に、モノクローナル抗体組成物は、それが免疫反応するすべての抗原に対して单一の結合アフィニティを示す。それ故、モノクローナル抗体組成物には、例えば二特異的モノクローナル抗体など種々の抗原に各々が免疫特異的な多数の抗体結合部位を有する抗体分子が含まれる。

一般にモノクローナル抗体は、1種類の抗体分子を分泌（生産）するハイブリドーマと呼ばれる单細胞クローンによって生産される抗体である。ハイブリドーマ細胞は、抗体産生細胞とミエローマまたは他の自己増殖性細胞系列との融合で作られる。このような抗体は、コラー (Kohler) およびミルシュタイン (Milstein)、Nature 256: 495-497 (1975) で始めて発表された（参考として引用する）。

3. モノクローナル抗体の生産方法

本発明は、(a) 本ポリペプチド、および(b) そのアミノ酸残基配列が対応

するインテグリンアルファサブユニットと免疫反応するモノクローナル抗体の生産方法に関する。この方法は、

(a) インテグリンアルファサブユニットまたは本ポリペプチドで動物を免疫化する。一般に、この事は、免疫学的有効量、即ち免疫応答を起こすのに十分な量の免疫原を免疫学的コンビメント哺乳動物に投与することにより行う。この哺乳動物には、ウサギ、ラットまたはマウスなどの齧歯動物が好ましい。この哺乳動物が免疫原と免疫反応する抗体分子を分泌する細胞を生産するのに十分な時間をこれを維持する。

(b) 免疫化動物から取り出した抗体産生細胞のサスペンションを調製する。一般に、この事は、動物の脾臓を取り出し、当分野でよく知られている方法で生理的に許容しうる培地中で機械的に個々の脾細胞に分離することによって行う。

(c) この懸濁した抗体産生細胞を、トランスホームした(不活性化した)細胞系列を生産しうるトランスホーム剤で処理する。トランスホーム剤および不活性化細胞系列の生産を目的としたその使用法は良く知られており、トランスホーム剤には、エブスタイン バー ウィルス (EBV)、シミアン ウィルス 40 (SV40)、ポリオマ ウィルス等のDNAウィルス、モロニー ムライン 白血病ウイルス (Mo-MuLV)、ロウス ザルコマ ウィルス等のRNAウイルス、P3X63-Ag8.653、Sp2/O-Ag14等のミエローマ細胞が含まれる。

好ましい態様において、トランスホーム剤処理を行い懸濁した脾細胞を適当な融合促進剤を用いて適当な細胞系列由來のマウスマイエローマ細胞と融合することによりハイブリドーマを生産している。細胞比は、約10⁵ 個の脾細胞を含むサスペンション中ミエローマ当たり約5個の脾細胞が好ましい。

使用する細胞は、所謂“薬剤耐性”で、未融合のミエローマ細胞は選択培地中で生存できないが、ハイブリッドは生存できることが望ましい。最も一般的なクラスとしては、ヒポキサンチン グアニン ホスホリボシル トランسفラーーゼを欠き、HAT (ヒポキサンチン、アミノブテリンおよびチミジン) 培地では維持されない8-アザグアニン耐性細胞系列がある。また、分離型を使用することもできるが、一般的に使用するミエローマ細胞系列は所謂“非分離”型でそれ

自体は抗体を分泌しないことが望ましい。しかし、ある場合には分泌型のほうが好ましいこともある。融合促進剤には、平均分子量約1000乃至4000 (PEG1000等として市販されている) のポリエチレンゴルががあるが、当分野で知られている他の促進剤も使用できる。

(d) トランスホーム細胞を好ましくは単クローン的にクローン化する。このクローン化は、非トランスホーム細胞を維持しない組織培養培地で行うことが望ましい。トランスホーム細胞がハイブリドーマである場合、一般には未融合のミエローマ細胞を維持しない選択培地中、未融合のミエローマ細胞が死ぬのに十分な時間(約1週間) 未融合脾細胞、未融合ミエローマ細胞および融合細胞の混合物を別々の容器で希釈、培養することによりこれを行う。希釈は、希釈容積を各容器(例えばマイクロプレートのウェル) 中、統計的に特定の細胞数(例えば1-4) を単離するよう計算する限界希釈法を使用できる。培地は、薬剤耐性(例えば、8-アザグアニン耐性) 未融合ミエローマ細胞系列を維持しないもの(例えばHAT培地) である。

(e) クローン化したトランスホーマントの組織培養培地は、免疫原およびそれに応答する本ポリペプチドまたはインテグリンアルファサブユニットと免疫反応する抗体の分泌で評価する。

(f) 一度望ましいトランスホーマントがステップ(e)で同定されれば、それを選択し適当な組織培養培地中で適当な時間増殖し、その培養上清から目的の抗体を回収する。適当な培地および培養時間はよく知られているか、または簡単に測定できる。

わずかに純度が落ちるモノクローナル抗体を高濃度で得るためにには、目的のハイブリドーマをマウス、好ましくは同系または準同系マウスに注入することが出来る。このハイブリドーマは適当なインキュベーション時間のうち、抗体産生腫瘍を形成し宿主マウスの血液および抹消浸出液(腹水) 中に高濃度の目的抗体(約5-20mg/ml) を放出する。

これらの組成物の調製に有用な媒体はよく知られており、市販されている。これには、合成培養培地、近交系マウスなどが含まれる。代表的合成培地には、4.5g/l グルコース、2.0mm ゲルタミンおよび2.0%ウシ胎児血清を

補ったダルベコ最小基礎培地 (DMEM; ダルベコ (Dulbecco) 等、Virol. 8:396 (1959)) がある。代表的近交系マウスには、Balb/cがある。

また、本発明のモノクローナル抗体は、固相中で該抗体が免疫反応する本ポリペプチドを使用したイムノアフィニティーコロマトグラフィー法でさらに精製することが出来る。

上述の方法で得たモノクローナル抗体は、インテグリンアルファサブユニット免疫反応産物が必要とされる診断および治療法で使用しうる。代表的反応産物にはGP II b 含有免疫反応産物が含まれる。

E. ハイブリドーマとその調製法

本発明のハイブリドーマは、本モノクローナル抗体を生産する能力を有する特徴を持つ。

本発明の好ましいハイブリドーマは、サイトアドヘシン、好ましくはGP II b とも免疫反応を起こす抗体分子を生産する特徴を有する。

目的的免疫特異性を有する、即ち特定の蛋白質、特定のタンパク質上の同定可能なエピトープ、および/またはポリペプチドと免疫反応する能力を有する抗体分子を生産、分泌するハイブリドーマを生産する方法は良く知られている。ナインマン(Nimman) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:4949-4953 (1983) およびガルフレ(Galfré) 等、Meth. Enzymol. 73:3-46 (1981) (参考として引用する) に述べられているハイブリドーマ技術は特に有用である。モノクローナル抗体の生産に関する代表的方法は、上述の文献に示されている。

F. 治療方法および組成物

本ポリペプチドを使用して、このポリペプチドに対応するインテグリンアルファサブユニットを発現する細胞のインビボでの粘着を調節することが出来る。

例えば、配列式p1またはp2、またはその両方に応する本ポリペプチドは、ヒトに有効量を投与したときに血小板の凝集を競合的に阻害しうる医薬的に許容しうる組成物に使用することが出来る。この阻害は血栓形成速度を低下させることによると考えられる。このようにインビボで本ポリペプチドを投与することで、

凝血や幾つかの炎症応答など粘着で開始する生理学的応答を調節することが出来る。

別の態様において、表面にインテグリンを有する細胞の正常な細胞粘着機能を阻害すべき細胞表面上のインテグリンのアルファサブユニットと免疫反応する本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体を含む医薬的に許容しうる組成物の有効量を静脈注射することで阻害または調節している。

好ましい態様において、血小板の凝集は、配列式p1またはp2のポリペプチドなどGP II b のフィブリノーゲン結合領域の一部に対応するポリペプチドと免疫反応する本ポリクローナル抗体を含む医薬的に許容しうる組成物の有効量を静脈投与することにより阻害しうる。

血小板凝集の好ましい調節方法は、GP II b のフィブリノーゲン結合領域(残基290-320) と免疫反応する本モノクローナル抗体の血小板凝集阻害量を投与することに関する。血小板凝集阻害治療法で使用するモノクローナル抗体は、さらに配列式p1またはp2に対応するポリペプチドと免疫反応する特徴を有することがより好ましい。

ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を治療的に使用して細胞粘着依存事象を調節しうる場合に限り、本発明は例えば抗ポリペプチド抗体に対する解毒剤として治療的に投与した抗体の調節効果を中和する目的で本ポリペプチドを使用することに関する。

この態様を実施する一つの方法として、先ず患者に抗血栓抗体含有治療薬を投与し細胞粘着、血小板凝集または血栓形成を抑える。次に、出血併発または投与した抗体の抗血栓効果を中和したい場合、投与した抗体と免疫反応し、その抗体の調節効果を中和するのに効果的な量のポリペプチドを投与する。

解毒剤として投与するポリペプチドの選択は中和する抗体に依存し、投与したポリペプチドが投与した抗体と免疫反応する能力を有することが必要である。

投与するポリクローナルまたはモノクローナル抗体分子含有組成物は、溶液またはサスペンションの形を取るが、ポリペプチドは錠剤、丸薬、カプセル、放出持続型成形物または粉末の形を取りうる。いずれの場合も、ポリペプチド含有組成物は一般的に活性成分として約0.1μM乃至約1.0M、好ましくは約1.0

μM 乃至約 1.0 mM の彰りペプチドを含むが、抗体分子と組成物は一般に活性成分として約 $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 乃至約 $2.0\text{ mg}/\text{ml}$ 、好ましくは約 $1\text{ mg}/\text{ml}$ 乃至約 $1.0\text{ mg}/\text{ml}$ の抗体を含む。

活性成分としてポリペプチドまたは抗体分子を含む治療組成物の調製法はよく知られている。一般に、これらの組成物は液体またはサスペンションなどの注入可能なものとして調製されるが、注射前に溶液やサスペンションなどの液体とするのに適した固体物として調製することもできる。また、この調製物をエマルジョン化する事もできる。また、良く知られているようにこの活性治療成分を医薬的に許容でき、かつ活性成分に適合する試形剤と混合する。適当な試形剤には、水、食塩水、デキストロース、グリセリン、エタノール等およびこれらの混合物がある。さらに、必要な場合はこの組成物に活性成分の効果を促進する湿润剤またはエマルジョン化剤、pH緩衝剤などの少量の補助剤を含めることが出来る。

ポリペプチドまたは抗体は、中和型の医薬的に許容しうる塩として治療組成物に形成しうる。医薬的に許容しうる塩には、例えば塩酸またはリン酸等の無機酸または酢酸、酒石酸、マンデル酸等の有機酸で形成される酸付加塩（ポリペプチドまたは抗体分子の遊離アミノ基と形成する）が含まれる。また、遊離したカルボキシル基で形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等の有機塩基から誘導される。

ポリペプチドまたは抗体含有治療組成物は、例えば単位投与の注射など従来の静脈注射で投与される。本発明の治療組成物に関して用いるとき、“単位投与量”とは、各単位が必要とされる希釈剤即ちキャリーまたはベヒクルと共に望ましい治療効果をあげると計算された所定量の活性物質を含む、ヒトへの单一投与に適した物理的に分離する単位を示す。

この組成物は、投与成形物および治療有効量に適した方法で投与される。投与する量は治療を受ける患者、活性成分を使用する患者の容量、および望ましいレセプターリガンド結合の阻害度に依存する。投与に必要とされる活性成分の詳細な量は、担当医の判断に依存し各個人で異なる。しかし、適当な投与範囲は、

1日1人当たり $1\text{ }\mu\text{M}$ 乃至数ミリグラムの活性成分のオーダーであり、投与経路にも依存する。また、第1投与および第2投与に関する適当な投与方法も様々であるが、典型的には第1投与に統一して注射または別の投与法で一時間以上の間隔を置いて繰り返し投与を行う。別に、治療有効血中濃度を維持するに十分な連続的静脈注入もできる。本ポリペプチドの治療有効血中濃度は、約 $1.0\text{ }\mu\text{M}$ 乃至約 1.0 mM 、好ましくは約 $5.0\text{ }\mu\text{M}$ 乃至約 1.0 mM の範囲である。本発明の抗体分子の治療有効血中濃度は、約 $0.1\text{ }\mu\text{M}$ 乃至約 $1.0\text{ }\mu\text{M}$ の範囲、好ましくは $1.0\text{ }\mu\text{M}$ である。

G. 診断システム

本発明のキット型の診断システムは、分包試薬として少なくとも1回の検定を行うのに十分な量の本発明のポリペプチド、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を含む。また、一般的には各包装試薬の使用説明書も含んでいる。

一般に使用説明書には、各試薬の濃度または少なくとも1回の検定を行うのに必要なパラメーター：混合する試薬とサンプルの相対量、試薬／サンプル混合物の維持時間、温度、バッファ条件等が示されている。

ある態様における血中または血漿等の血小板含有血液試料に含まれる活性血小板を検定する診断システムには、配列式p1またはp2に対応するポリペプチドと免疫反応する本モノクローナル抗体を含むパッケージが含まれる。別の態様では、血小板含有血液サンプル中の活性血小板を検定する診断システムには、GP IIbのフィブリノーゲン結合領域（残基290-320）によって形成されるエピトープと免疫反応し、好ましくは配列式p1またはp2に対応するポリペプチドとも免疫反応する本モノクローナル抗体を含むパッケージが含まれている。また、診断システムで行われる検定法が競合的免疫反応様式を採用している場合、このシステムは本ポリペプチドも含まれる。ポリクローナルまたはモノクローナル抗体の抗体分子がラベルに結合しているキットならばさらに好ましい。

このように好ましい態様の診断システムには、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の抗体分子を含む複合体の生成を知らせうるラベルまたは指示手段が含まれる。

本明細書で使用している“複合体”という言葉は、抗体-抗原またはレセプタ

リガンド反応など特異的結合反応の産物を示す。

本明細書で使用する種々の文法型の“ラベル”または“指示手段”という言葉は、複合体の存在を指示する検出可能なシグナルの生産に直接的または間接的に関係する単一原子または分子を示す。“インピボ”でのラベルまたは指示手段とはヒトの体内で有用なもので、 ^{111}In , ^{99}Tc , ^{113}Ga , ^{116}Re 、および ^{131}I が含まれる。どのラベルまたは指示手段も本発明の抗体またはモノクローナル抗体組成物の一部である発現したタンパク質、ポリペプチドまたは抗体分子に結合するか、または組み込まれることができるが、また分離した形で使用されることもできる。また、これらの原子または分子は単独か、もしくは他の試薬とともに使用しうる。これらのラベルは臨床診断化学の分野ではよく知られており、これらはこの新しいタンパク質の方法、および/またはシステムで使用する場合に限り本発明の一部を構成する。

ラベルの結合法、即ちポリペプチドおよびタンパク質のラベル化法は当分野でよく知られている。例えば、ハイブリドーマにより生産される抗体分子は、培養培地中に成分として提供されるラジオアイソトープ含有アミノ酸の代謝的取り込みでラベル化しうる。例えば、ガルフレ（Galfré）等、*Meth. Enzymol.*, 73:3-46 (1981) 参照。活性化した官能基を介するタンパク質の結合技術は特に有用である。例えば、オーラメス（Aurameas）等、*Scand. J. Immunol.*, Vol. 8 Suppl. 7:7-23 (1978)、ロッドウェル（Rodwell）等、*Biotech.*, 3:889-894 (1984) およびU. S. Pat. No. 4,493,795 参照。

また、この診断システムは、好ましくは分包して特異的結合剤を含むことが出来る。“特異的結合剤”とは、本発明の試薬を選択的に結合しうるが、それ自身が本発明のタンパク質発現産物、ポリペプチド、または抗体分子ではない分子である。代表的な特異的結合剤には、抗体分子、補体タンパク質またはそのフラグメント、プロテインA等がある。この特異的結合剤は、本発明の抗体分子またはポリペプチドが複合体の一部として存在する場合、これに結合しうることが望ましい。

好ましい態様では、特異的結合剤がラベル化されている。しかし、診断システムがラベル化していない特異的結合剤を含む場合、一般にこの試薬は増幅手段または増幅試薬として使用される。これらの態様において、ラベル化された特異的結合剤は、増幅手段が試薬含有複合体に結合したとき特異的に増幅手段に結合しうる。

本発明の診断キットを“ELISA”的に使用して、血清、血漿または尿等の体液サンプル中のフィブリノーゲン結合血小板の存在または量を検出することが出来る。“ELISA”とは、固相に結合した抗体または抗原および酵素-抗原または酵素-抗体結合体を用い、サンプル中に存在する抗原または抗体の検出または定量を行う酵素結合免疫吸着検定法である。ELISA法の説明は、1982年、C.A. ロスマラス、ラングメディカルパブリケーション版、D. P. サイツ（Sites）等、“基礎および臨床免疫学”第4編、第22章、およびU. S. Pat. No. 3,654,990; No. 3,850,752 およびNo. 4,016,043 参照（いずれも参考として引用する）。

このように、好ましい態様では本発明の発現タンパク質、ポリペプチド、または抗体分子が固体マトリクスに固定化され、本診断システム中別に包装されている固体サポートを形成している。

一般に、これらの試薬は水性媒体からの吸着により固体マトリクスに固定化されるが、当分野でよく知られている別の固定化法も使用しうる。

有用な固体マトリクスはよく知られている。これらのマトリクスには、ファルマシア・ファイン・ケミカルズ（N.J. ビスカタウェイ）から登録商標SEPHADEXで市販されている架橋デキストリン、アガロース、I.L. ノースシカゴ、アボットラボラトリーズから市販されている直径約1ミクロン乃至約5ミリメートルのポリスチレンビーズ、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、架橋ポリアクリルアミド、シート、断片、またはヘラ等のニトロセルロースまたはナイロン製織物、またはチューブ、板、またはポリスチレンまたはポリ塩化ビニル製のマイクロプレートのウェル等が含まれる。

本明細書で述べている診断システムの試薬類、ラベル化特異的結合剤、または増幅試薬は、溶液、液体分散物、または凍結乾燥物などの実質的に乾燥し

た粉末として提供しうる。指示手段が酵素の場合、その酵素の基質も診断システムに別のパッケージとして提供しうる。先に述べたマイクロプレート等の固体サポートや一つ以上のパッファも本診断検定システムに別々のパッケージとして含まれることが出来る。

診断システムに関してここで議論しているパッケージは、一般に診断システムに使用されているものである。このようなパッケージには、ガラスやプラスチック（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネート）の瓶、バイアル、プラスチックまたはプラスチックコートした包装物等がある。

H. 検定法

本発明は、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体中に含まれる抗体分子を含む複合体を生成することにより、インテグリンアルファサブユニット、特にGP II bを検出する方法に関する。これらの複合体を生成するのに使用できる臨床診断学技術がたくさんあることは良く知られている。身体サンプル中のインテグリンアルファサブユニットの存在を検出するのに使用しうる、競合的または非競合的な異種または同種の検定法がいろいろある。従って、ここでは代表的な検定法を説明するが、これによって本発明が制限されることはない。

例えば、ヘパリン保存（非凝血）血液サンプルと¹²⁵I-ラベル化抗体分子を混合する。この免疫反応混合物を、活性化血小板がラベル化抗体と免疫反応しラベル化免疫反応産物を生成するのに十分な時間、免疫学的検定条件下に維持する。それから、一般的にはサンプル中に存在するすべての血小板をペレットとするのに十分な遠心によりラベル化免疫反応産物を未反応ラベル化抗体と分離する。生成したラベル化免疫反応産物の量を検定する。

免疫学的検定条件とは、本発明のポリクローナルまたはモノクローナル抗体中に含まれる抗体分子および検定すべきインテグリン分子の免疫学的活性を維持する条件である。これらの条件には、約4°C乃至約45°Cの範囲、好ましくは約37°Cの温度、約5乃至約9の範囲、好ましくは約7のpH値および蒸留水から約1モル濃度の食塩水の範囲、好ましくは約生理食塩水のイオン強度が含まれている。これらの条件を最適化する方法は良く知られている。

りどのような修正も可能である。しかし、第1図に示した配列と全く相同的な配列を含むDNA分子が好ましい。

一般的に、本発明のDNA分子は粘着末端、すなわち、この分子の二本鎖部分から張り出した“突出”一本鎖部分を有している。本発明のDNA分子に粘着末端が存在したほうが望ましい。

また、本発明は上述のDNAセグメントと等価なリボ核酸（RNA）に関する。
J. 組み換えDNA分子

本発明の組み換えDNA分子は、本発明のDNAセグメント、好ましくは表2に示した配列式に対応する本ポリペプチドをコードするDNAセグメントをベクターに機能的に結合することで生成できる。

本明細書で使用している“ベクター”という言葉は、細胞内で自己複製でき、かつ別のDNAセグメントを機能的に結合することで付加したセグメントも複製させうるDNA分子を表す。GP II b関連アミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現を指令しうるベクターは、“発現ベクター”と呼ぶ。従って、組み換えDNA分子（rDNA）は、通常天然には一緒に存在しない少なくとも2つのスクレオチド配列を含むハイブリッド分子である。

本発明のDNAセグメントを機能的に結合するベクターの選択は、当分野でよく知られているように必要とされる機能、例えばタンパク質発現、およびトランスポームする宿主に直接依存する。これらは組み換えDNA分子を構築する上で本質的な制限となる。しかし、本発明に関するベクターは、少なくとも機能的に結合したDNAセグメントに含まれるインテグリンアルファサブユニット関連アミノ酸残基配列を有するポリペプチドをコードする遺伝子の複製、好ましくは発現も指令することが出来る。

好ましい態様における本発明に関するベクターには、原核性レブリコン、即ちトランスポームしたバクテリア宿主細胞などの原核性宿主細胞中、染色体外で組み換えDNA分子の自己複製および雄性を指令しうる能力を有するDNA配列を含む。このようなレブリコンは良く知られている。さらに、原核性レブリコンを含むこれらの態様には、トランスポームしたバクテリア宿主に薬剤耐性を提供する遺伝子も含まれる。典型的なバクテリアの薬剤耐性遺伝子には、アンビシリ

I. DNAセグメント

生物において、タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸残基配列は、そのタンパク質をコードする構造遺伝子のデオキシリボ核酸（DNA）配列に遺伝子コードを介して直接関連している。従って、構造遺伝子は、それがコードするアミノ酸残基配列、即ちタンパク質またはポリペプチドに関して限定されうる。即ち、タンパク質を生成するのに使用されるほとんどのアミノ酸に関して、1つ以上のスクレオチドトリプレット（コドン）が、特定のアミノ酸残基をコード、または指定している。それゆえ、多くの異なるスクレオチド配列が、1つの特定のアミノ酸残基配列をコードしうる。このようなスクレオチド配列は、すべての生物において同じアミノ酸残基配列を生産しうることから、機能的に等価であると考えることが出来る。場合によっては、プリンまたはビリミジンのメチル化変異体が所定のスクレオチド配列中に組み込まれることがある。しかし、このようなメチル化はコード関係に全く影響しない。

本発明のDNAセグメントは多くとも約2000スクレオチド塩基対からなり、第1図に示すアミノ酸残基290-320に位置するGP II b配列に相同的なインテグリンアルファサブユニットアミノ酸残基配列を含む本ポリペプチドをコードする構造遺伝子を含んでいる。

本発明の好ましいDNAセグメントは、表2に示した配列式で表されるポリペプチド配列に対応するか、好ましくはこの配列に一致するアミノ酸残基配列をコードするDNA配列を含む。このDNA配列は、各コドンが上述のアミノ酸残基配列中に存在するアミノ酸残基をコードしており、介在配列を含まない一連のコドンとして存在する、即ちこのDNA配列がイントロンを含まないことが望ましい。

従って、基本的に第1図で示した約塩基980から約塩基1012までのスクレオチド配列を含むDNA配列が本発明の一つの態様を構成している。

本発明のDNAセグメントは、例えばマテウシ（Matteucci）等、J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981) のホスホトリエster法等の化学的方法で容易に合成しうる。もちろん、コード配列の化学的合成により本来のアミノ酸残基配列をコードする塩基を適当な塩基に置換することによ

りて、またはテトラサイクリンに対する耐性を与えるものがある。

原核性レブリコンを含むこれらのベクターには、トランスポームした大腸菌などのバクテリア宿主でGP II b関連アミノ酸残基配列の発現（転写および翻訳）を指令しうる原核性プロモーターを含めることができる。プロモーターとは、RNAポリメラーゼが結合し転写を起こしうるDNA配列で構成される発現コントロール要素である。一般に、バクテリア宿主に適合するプロモーター配列は、本発明のDNAセグメントの挿入に便利な制限部位を含むプラスミドベクターに提供されている。これらのベクタープラスミドの例には、バイオラドラボラトリ（リッチモンド、CA）から市販されているpUC8、pUC9、pBR322およびpBR329、およびファルマシア（ビスカタウェイ、NJ）から市販されているpPLおよびpKK223がある。

真核細胞に適合する発現ベクター、好ましくは脊椎細胞に適合する発現ベクターも、本発明の組み換えDNA分子を生成するのに使用できる。真核細胞ベクターもよく知られており、いくつかの業者から市販されている。一般に、目的のDNAセグメントの挿入に便利な制限部位を含むベクターが提供されている。このようなベクターには、pSVLおよびpKSV-10（ファルマシア）、pBPPV-1/pML2d（インターナショナルバイオテクノロジー）およびpTDT1（ATCC, #31255）がある。

好ましい態様において、本発明の組み換えDNA分子を構築するのに使用する真核細胞発現ベクターには、真核細胞中で有効な選択マーカー、好ましくは薬剤耐性選択マーカーが含まれる。好ましい薬剤耐性マーカーには、ネオマイシン耐性を発現させる遺伝子、即ちネオマイシンホスホトランスフェラーゼ（neo）遺伝子がある。サザン（Southern）等、J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341 (1982)。また、本発明は、本発明のrDNAを生成するためのレトロウイルス発現ベクターの使用に関する。本明細書で使用している“レトロウイルス発現ベクター”とは、レトロウイルスゲノムのラングターミナルリピート（LTR）領域由来のプロモーター領域を含むDNA分子である。

一般に、好ましい態様における発現ベクターは、好ましくは真核細胞において

均できないレトロウイルス発現ベクターである。レトロウイルスベクターの構造および使用については、ソルジ (Sorge) 等、Mol. Cell. Biol., 4: 1730-37 (1984) に示されている。

相補的粘着末端を介してベクターにDNAを機能的に結合する様々な方法が開発されてきている。例えば、相補的ホモポリマーを挿入するDNAセグメントとベクター-DNAに付加することができる。このベクターとDNAセグメントを相補的ホモポリマー間の水素結合で結合し組み換えDNA分子を得ることが出来る。

一つ以上の制限部位を含む合成リンクーの使用は、DNAセグメントとベクターを結合する別の方法を提供する。粘着末端を有するDNAセグメントを、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼIで処理して、それらの3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性で突出する3'一本鎖末端を除き、かつそれらのポリメラーゼ活性で凹んだ3'末端を充填する。それゆえ、これらの活性の組み合わせから平滑末端DNAセグメントが生成する。この平滑末端セグメントをバクテリオファージT4 DNAリガーゼ等の平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒する酵素の存在下、過剰モル比のリンクー分子とインキュベートする。この反応の産物は、その末端にポリマーリンカー配列を有するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントを適当な制限酵素で切断し、そのDNAセグメントに適合する末端を生ずる酵素で切断した発現ベクターにライゲーションする。

種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンクーは、インターナショナルバイオテクノロジーズ(ニューヘブン、CN)を含む多くの業者から市販されている。

また、本発明は、先に述べた組み換えDNA分子と等価なRNAに関する。

K. トランスホーム細胞とその培養

また、本発明は、本発明の組み換えDNA分子でトランスホームした宿主細胞に関する。この宿主細胞は原核細胞でも真核細胞でもよい。バクテリア細胞では原核細胞が望ましく、一般には、ベセダ リサーチ ラボラトリーズ(ベセダ、MD)から市販されている大腸菌DH5株などの大腸菌株が使用される。好ましい真核宿主細胞には、イーストおよび哺乳類細胞、好ましくはマウス、ラッ

ト、サル、またはヒトの脊椎芽細胞、造血細胞が含まれる。好ましい真核宿主細胞には、CCL61としてATCCから入手できるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞およびCRL1658としてATCCから入手できるNIHスイスマウス胚細胞NIH/3T3がある。

本発明の組み換えDNA分子による適当な宿主細胞のトランスホーメーションは、一概に使用するベクターのタイプに依存した良く知られている方法で行われる。原核宿主細胞のトランスホーメーションに関しては、例えばコーエン(Cohen)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972) およびマニアチス(Maniatis)等、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, コールドスプリングハーバーラボラトリーズ、コールドスプリングハーバー、NY (1982) 参照。rDNAを含むレトロウイルスベクターによる脊椎細胞のトランスホーメーションに関しては、例えばソルジ(Sorge)等、Mol. Cell. Biol., 4: 1730-37 (1984); グラハム(Graham)等、Virology, 52: 456 (1973); およびウィグラー(Wigler)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 1373-76 (1979) 参照。

トランスホーメーションが成功した細胞、即ち本発明の組み換えDNA分子を含む細胞は從来法で同定しうる。例えば、本発明のrDNAの導入で生じた細胞をモノクローナル抗体を作ることでクローニングできる。このコロニー由來の細胞を収穫、溶解し、その内容物をサザン(Southern)、J. Mol. Biol., 98: 503 (1975) またはバレンタ(Berent)等、Biotech. 3: 208 (1985) の方法でrDNAの存在について検定する。

rDNAの存在に関する直接的検定のほかに、rDNAが本ポリペプチドの発現を指令しうる場合は、トランスホーメーションの成功は從来の免疫学的方法で確認しうる。例えば、発現ベクターを含む本rDNAでトランスホーメーションした細胞は、特徴的な抗原性を示すポリペプチドを生産する。トランスホーメーションした細胞を含む培養サンプルを収穫し、本発明のハイブリドーマが生産するようなポ

リペプチド抗原に特異的な抗体で本ポリペプチドを検定する。

このように、トランスホーメーション宿主細胞自体に加えて、本発明はこれらの細胞の培養物、好ましくは栄養培地でのモノクローナル(クローニング的に均一な)培養物、またはモノクローナル培養由来の培養物に関する。また、この培養物はインテグリンベータサブユニット抗原性を示すタンパク質を含むことが好ましい。

トランスホーメン宿主細胞の培養に有用な栄養培地はよく知られており、いくつかの業者から市販されている。宿主細胞が哺乳類である想様では、“無血清”培地を使用することが望ましい。

L. 本ポリペプチドの生産方法

本発明にもう一つの特徴に、本発明の診断システムおよび方法に使用しうる抗体を生産するのに有効な本ポリペプチドの生産方法がある。

本方法は、本ポリペプチド、好ましくは表2に示されている配列式に対応するポリペプチドを発現しうる本発明の組み換えDNA分子でトランスホーメン宿主細胞を含む栄養培地での培養を行うことを含む。この培養を、トランスホーメン細胞が本ポリペプチドを発現するのに十分な時間維持する。次いで、発現したポリペプチドをこの培養物から回収する。

培養物から発現したポリペプチドを回収する方法はよく知られており、従来の生化学的技術を用いた培養物のポリペプチド含有成分の分画を含む。例えば、タンパク質分画法として知られているゲル通過、ゲルクロマトグラフィー、超遠心、電気泳動、イオン交換等の方法を用いて、培養物中に存在する発現タンパク質を単離できる。さらに、イムノアフィニティー、免疫吸着等の免疫化学的方法は従来法を用いて行なうことが出来る。

実施例

以下に示す実施例は本発明を説明するもので、これを制限するものではない。

I. インテグリンのリガンド結合領域の同定

化学的架橋を用いてGP IIb-IIIaとRGD含有リガンドとの相互作用の研究が行われている。ベネット(Bennett)等、J. Biol. Chem. 257: 8049 (1982)。最近、架橋技術を用いて、RGD認識部位のトポグラフィーを特徴付ける手段としてGP IIb-IIIaと6から14個のアミノ酸から

なる小さなRGDペプチドとの相互作用が調べられた。サンテロ(Santoro)等、Cell, 48: 867 (1987) およびドソザ(D'Souza)等、J. Biol. Chem. 263: 3943 (1988)。これらの研究は、GP IIb-IIIaへのフィブリノーゲンおよびフィブロネクチン等の粘着タンパク質の結合に必要な事象であるアゴニストによる血小板の活性化は、インテグリンGP IIb-IIIaへのペータサブユニット、GP IIIaへのRGDペプチドの架橋を著しくかつ選択性的に促進することを示している。

本研究は、小さいフィブリノーゲン由来のペプチドが化学的に架橋しうるGP IIb内の部位を限定している。この部位は、インテグリンのアルファサブユニットへのリガンド結合に関する一般的な機能部位であると考えられており、ここではインテグリンのアルファサブユニット上のリガンド結合領域と呼ぶ。この領域のアミノ酸残基配列は、インテグリン群のなかで比較的保存されており(表1)、この事はそれが粘着レセプターの中のこの群の機能において重要な役割を果たしていることを示している。

A. フィブリノーゲンペプチドの調製

K16と命名され、フィブリノーゲン由来のペプチドは、アミノ酸残基配列 KYGGHHHLGGAKQAGDV を有する。このペプチドは、架橋を可能にするためのリジン残基(K)およびラジオヨージネーションのための部位を提供するチロシン残基(Y)を含むよう設計した。K16は、ペプチジルグリシン-a-アミーディング・モノオキシゲナース・レジンおよびアブライド・バイオシステムズ・モデル430・ペプチドシンセサイザー(フォスター・ティー、CA)による固相合成で合成した。このペプチドの純度は、0.1%トリフルオロ酢酸中0-6%アセトニトリル/1%ボンダーパクカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析し、85%以上の純度であることが分かった。このペプチドのアミノ酸組成は、6N HClによる24時間加水分解物の分析で測定し、その結果は理論値と一致した。ペプチドは使用前にリソ酸緩衝液に溶かし、pHは7.2に調整した。ここで述べている他のポリペプチドも上述の方法で調製した。

K16は、ラクトバーオキシダーゼーグルコースオキシダーゼ法の修正法を用いて放射性沃素化した。ラム (Lam) 等、J. Biol. Chem. 262: 947-950 (1987) 参照。簡単にいうと、グルコース (0.2M リン酸ナトリウム (pH 7.4) 80 μl 中 40 μg)、キャリヤーフリー Na¹³¹I (15ミリキューリー) およびエンザイモビーズ (バイオラド、リッチモンド、CA) を 1.0 mg の K16 ベブチドに添加し、この反応をエンザイモビーズの説明にしたがって実施した。その後、沃素化したベブチドをバイオラド P-2 カラムを用いたゲル通過で他の試薬と分離した。沃素化の条件はリガンドの純度が高くなるように選択し、この方法で生成した沃素かベブチドの 8.0% 以上はモノ沃素化チロシン型であった。ラベル化ベブチドの濃度は、アミノ酸組成から誘導される吸光係数を用いた 280 nm の吸光度で測定した。このベブチドの比活性は、約 5-8 mCi/mg であった。

B. 血小板の調製およびベブチド K16 の GP II b 上の各部位への化学的架橋
ディファレンシャル遠心および 0.1% ウシ血清アルブミンを含む二価イオンフリーのトローズバッファ (pH 7.3) 中でのセファロース 2B によるゲル通過により酸/クエン酸/デキストロース中に回収した新鮮なヒトの血液から単離した。マーゲリー (Marguerie) 等、J. Biol. Chem. 225: 154-161 (1980) 参照。

血小板による K16 の結合は、粘着タンパク質およびこのベブチドおよびその他のベブチドと血小板との相互作用の測定に関して先に述べた方法にしたがった。ギンスバーグ (Ginsberg) 等、J. Biol. Chem. 260: 3931-3936 (1985); ラム (Lam) 等、Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 44: 1126 (1985); およびマーゲリー (Marguerie) 等、上述参照。簡単にいうと、血小板を 4 × 10⁸/ml となるように二価イオンフリーのトロードアルブミンバッファに懸濁した。特に述べないかぎり、Ca²⁺ は最終濃度 1 mM となるように添加した。血小板の刺激には、0.5 ユニット/ml のアルファートロンビンを使用した。フィブリノーゲンおよびトロンビンから存在する検定では、トロンビン添加の 5 分後で、かつフィブリノーゲン添加の 5 分前にこの血小板サスペンションに 3.0 nM D

-フェニルアラニル-L-プロピルジニケトン (カルバイオケム、ラジオ、CA) を添加した。ラジオラベル化したペプチドを 3.0 μM となるように 6 × 10⁴ 細胞/ml の刺激化または非刺激化血小板に添加し、結合反応を 22°C で 4.5 分間行った。その後、選択した架橋剤を添加した。この実験で使用するビアスケミカルから市販されている架橋剤ビス (スルホスクシンイミジル) スペレート (BS³) を使用直前に PBS に溶かし、最終濃度 0.2 mM となるよう血小板と混合した。22°C、10 分間の架橋反応は、1.0 mM トリス-HCl (pH 7.0) の添加で停止した。

2.0% スクロースを用いた遠心で細胞結合リガンドを回収し、その細胞を 1% ノニテント P-40 および 1.0 mM N-エチルマレイミド (シグマ) を含む PBS 中で抽出した。抽出したタンパク質を 10% トリクロロ酢酸で沈殿し、遠心後得られたペレットを 8.5% 冷エタノールで洗浄した。この架橋サンプルは、レムリ (Laemmli)、Nature, 227: 680-685 (1970) のバッファシステムを用いたポリアクリルアミド垂直スラブゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。ジスルフィド結合を還元するために、このサンプルを 5% 2-メルカプトエタノールで処理した。ゲルを乾燥し、コダック X-Omat AR フィルムでオートラジオグラムを作成した。ダイバーシファイドバイオテク (MA) から得られる標準物質との相対的電気泳動移動度から分子量を見積もった。

C. イムノプロロッティング操作

GP II b の重鎖を認識する PMI-1 というモノクローナル抗体を用いて架橋サンプルを免疫沈没させた。ロフタス (Loftus) 等、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84: 7114 (1987)。上述の架橋サンプルから得られる洗浄した酸沈殿物を、0.02 M トリス-HCl (pH 7.4) 中、0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, 1.0 mM ベンズアミジン-HCl, ダイズトリプシンインヒビター (1.0 μg/ml), 0.2 mM フェニルメタヌルフォニル フルオライド, 1% (v/v) Triton X-100, 0.05% Tween 20, 0.02% NaN₃, およびトラシロール (5 ユニット/ml) を含む免疫沈没バッファ (IPB) 250 μl に溶

かした。IPB は、GP II b-III a の複合体を解離させることができた。このサンプルを加熱不活性化正常ウサギ血清 1.5 μl についてプロテイン A 試薬 (パンソービン、ベーリング ダイアグノスチス) を添加することによりこのサンプルを清澄化した。清澄化した分解物に 1% ウシ血清アルブミン 1.5 μl および上述のモノクローナル抗体 1.0 μl を含む IPB 1.50 μl を加え、4°C で一晩インキュベーションしたのちに、パンソービンを添加した。22°C、1 時間後、このサンプルを遠心し、回収した免疫沈没物をレムリサンプルバッファ中 1.00°C で 3 分間加熱して溶解した。その後、これを先に述べた SDS-PAGE で分析した。イムノプロロッティングでは、先に述べた SDS-PAGE でタンパク質を分画し、電気泳動後、分画したタンパク質をポリビニリデンジフルオラシドメンブレン (PVDF) に移した。この転写物を抗 GP II b モノクローナル抗体 PMI-1、または GP II b の重鎖または軽鎖に対応する配列を有するベブチドに対するウサギ抗血清で検定した。ロフタス (Loftus) 等、J. Biol. Chem. 263: 11025-11028 (1988)。結合した抗体の検出は、基質としての 4-クロロ-1-ナフトールおよびホースラディッシュバーオキシダーゼ (バイオラド) に結合した抗マウスまたは抗ウサギ IgG を用いて行った。

第2図Aは、上述の操作にしたがってトロンビン活性化血小板に架橋した ¹³¹I-K16 のオートラジオグラムを示している。放射能は、GP II b と同じ電気泳動移動度を有する単一主要バンドとして移動した。GP III a の位置には、わずかな放射能しか検出されなかった。5.0 倍過剰量の非ラベル化 K16 は、当初特異性を示した細胞へのラベル化ベブチドの架橋を妨害した (パネルA、右レーン)。主要放射性バンドが GP II b であることは、GP II b に対するモノクローナル抗体との免疫沈没によって示された (第2図B)。シャドル (Shadole) 等、J. Cell. Biol. 99: 2056-2060 (1984)。この抗体 PMI-1 は、血小板抽出物中の主要放射性バンドを免疫沈没させるが、一方、他の血小板タンパク質に対する同サブクラスのモノクローナル抗体を含む種々のコントロール抗体は、この放射性バンドを免疫沈没化することは出来なかった。多くの架橋実験で、ゲルの上に種々の量の放射性物質が蓄積していることが分かった。第2図Bの免疫沈没実験で、高分子量放射性物質の少なくとも一部には G

II b 抗原が含まれていることが示された。

血小板の活性化は、GP II b に対する ¹³¹I-K16 の架橋に著しく影響した (第2図C)。ADP、PMA およびトロンビンはすべて、非刺激化血小板で観察される場合と比較して GP II b に対する K16 の架橋を増加した。非活性化血小板と比べて、トロンビン刺激は GP II b への K16 の架橋を 1.2 倍増加した (実験4回)。架橋の増加は、刺激化細胞への K16 の結合の増加ならびに架橋効率の増加に起因する。また、以下の 2 つの架橋剤、3, 3'-ジチオビス (スルホスクシンイミジル ブロビオネット) およびジチオビス (スクシンイミジル ブロビオネット) によても、刺激化血小板状の GP II b へのこのベブチドの架橋の増加が見られた。関連する部位への K16 ベブチドの特異的架橋に関する明白な証拠を提供する上記のデータを下に、以下の方法で GP II b サブユニット内の部位を特定した。最初のステップで ¹³¹I-K16 が GP II b の重鎖または軽鎖と会合しているかどうかを測定した。¹³¹I-K16 はトロンビン刺激化血小板に架橋していた。¹³¹I-K16 複合体の放射性バンドを非還元条件下で泳動したゲルから切りだし、抽出後、還元条件下で再び泳動した。それから、サンプルをゲルから PVDF メンブレンに移し、抗体によるイムノプロロッティングまたはオートラジオグラフィーで検定した。イムノプロロッティングには、先に述べた 2 つの抗ベブチド抗体: GP II b 重鎖のカルボキシ末端に存在する 1.7 アミノ酸残基のベブチド配列に対する抗体 (抗 V43)、および GP II b 軽鎖のアミノ末端に存在する 1.3 アミノ酸残基のベブチド配列に対する抗体 (抗 V41) を使用した。ロフタス (Loftus) 等、J. Biol. Chem. 263: 11025-11028 (1988)。これら 2 つの抗体で展開したイムノプロロットは、K16 への架橋後の GP II b は、なおその重鎖および軽鎖構成物へと還元されるることを明確に示している。このサンプルのオートラジオグラムは、すべての検出可能な放射能は重鎖の位置に泳動していることを示した。軽鎖および重鎖を含むゲルの部分をゲルから切りだし、計数してみると放射能の 2% 以下が軽鎖の位置に存在し、9.8% が重鎖の位置に存在した。¹³¹I-K16 抽出物を非還元条件下の第 2 のゲルで泳動すると、放射性バンドの強度は、第 2 のゲルにおける放射能の回収のコントロールを提供する還元条件下 (第3図参照) での GP II b 重鎖で

見られる強度と同じであった。第2のゲルのアクリル酸濃度が低い場合(7.5%)、ラベル化GP II b重鎖および本来のGP II b各々の還元($R_f = 0.32$)および非還元条件下($R_f = 0.28$)での移動度の差は明らかであった。

D. リガンド結合部位の同定を目的としたGP II bの断片化

GP II b重鎖内のK16架橋部位を特定するために、部位特異的モノクローナル抗体PMI-1を用いた免疫化学的マッピング法を採用した。この抗体はGP II b重鎖のカルボキシ末端の10アミノ酸残基を認識する。ロフタス(Loftus)等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7113-18(1987)。GP II b重鎖: K16複合体を実施例1Cに従った還元条件下の泳動ゲルから抽出しキモトリブシンで短時間処理した。抽出したGP II b重鎖: K16複合体約10 μ gを22°C、10分間、5 μ gのアルファキモトリブシンで消化した。消化物を電気泳動し、実施例1Cの方法にしたがってPMI-1を用いてイムノプロッティングを行った(第4図)。部分消化では、PMI-1は、60kDaの位置に泳動する主要フラグメント並びに32および20kDaの位置の2つより低分子のフラグメントと免疫反応した(第4図、レーン2)。転移メンブレンのオートラジオグラムを実施例1Cにしたがって作成した。これは、PMI-1が免疫反応する60kDaのフラグメントが放射活性ではないことを示している(第4図、レーン4)。その代わりに、3つのより低分子量のフラグメントが検出され、これらはPMI-1ポジティブのフラグメントのどれとも一致しなかった。これらの結果は、重鎖のカルボキシ末端からアミノ末端側へ延びているGP II bの60kDa領域は、K16架橋部位を含まないことを示している。逆に、これらのデータは架橋部位がGP II b重鎖のアミノ末端側半分にあることを示している。

さらに、K16架橋部位を特定するためにSDS-PAGEゲルから単離したGP II b: K16複合体を臭化シアン(CNB r)で切断した。再電気泳動およびゲル転移により、主要な40kDa放射性フラグメントが観測された(第5図)。この放射性フラグメントをSDS-PAGEゲルから抽出し、アブライド・バイオシステム・モデル474A・気相シーカエネーターでアミノ末端配列分析した。

40kDaフラグメントのシーケンシングの結果は、14サイクルで不明瞭な配列が得られることを示している。この配列は(第5図)、GP II b重鎖のアミノ末端配列と全く一致していた。さらに2回の放射性CNBrフラグメント調製物の同様の分析でも、GP II bアミノ末端配列に対応する配列が得られた。コントロール実験は、CNBr切断部位をタンパク質のメチオニン残基に限定するCNBr反応で使用する条件下で、GP II bが核酸切断に感受性を持たないことを示した。最初の3個のメチオニン残基は、GP II bの部位285, 314および489に存在した。ここで使用したアミノ酸残基部位番号については、第1図参照。最初の2つの部位のいずれかでのCNBr切断では、観測される40kDaフラグメントに一致する30-40kDaレンジ(この領域には、2つの潜在的Asn結合グリコシル化部位が存在し、正確な分子量は計算できない)のフラグメントを生ずる。一方、第3のメチオニン残基でのCNBr切断では、54kDa以上のフラグメントを生ずる。従って、K16架橋部位は、GP II bの最初の314アミノ酸残基に限定されると考えられる。場合によって、CNBr消化物に放射性のダブルトバンドが観測される。そのより高分子量のバンドは54kDaと見積もられる。この第2のバンドは、第5図のCNBr消化物においても明白である。この上のバンドのアミノ酸残基配列を決定すると、測定した10ヶ所からの部位でGP II bのアミノ末端配列に対応していた。従って、このフラグメントは、部位489のメチオニン残基におけるCNBr切断に由来するといえる。さらに、これら2つのフラグメント内の放射能は、第5図に示したゲルに投入した放射能の8%であった。

キモトリブシンによるGP II b重鎖: K16複合体の制限消化では、単一の7kDa放射性フラグメントが生じた(第5図)。GP II b: K16複合体中の放射能の90%以上がこの7kDaバンドとして回収された。このバンドのアミノ末端の6個の残基を決定すると、GP II b配列の残基294からの配列に対応していた。この7kDaフラグメントの3回の独立した調製物の配列分析で、少なくともGP II bの残基294-296に独特なアミノ酸残基配列AVTが示された。残基294で始まる7kDaフラグメントは、約60残基のアミノ酸を含み、残基350付近で終わっている筈である。

この位置を確定するためにSV8を用いてGP II b重鎖: K16複合体を消化した。この消化物のペプチドパターンは非常に複雑であった。それで、まずこれをC4カラムでのHPLCにかけた。放射性画分を採取し、10-20%勾配ゲルで電気泳動し、PVDFメンブレンに移した。この転移物のオートラジオグラフィーは、ゲルに投入した放射能の95%を含む8-9kDa領域のブロードなバンドを与えた(第5図)。このバンドのアミノ酸シーケンシングで二つの鑑別しうる配列が確認された。1つの配列はSV8のアミノ末端配列に対応し、おそらく放射性バンドと共に泳動する酵素の蛋白質分解フラグメントに由来する。得られた第2の配列は、16サイクルまで読むことが出来、この16個の部位のうちの13個は説明できるシグナルを提供した。この配列は、GP II bの残基253から始まる配列に対応していた。残基253から始まる9kDaのフラグメントには、約80残基のアミノ酸が含まれており、残基350付近で終わっている。

K16架橋部位の決定に関するデータを第6図に模式的に示した。ステップ1でこの架橋部位はGP II bの重鎖領域に限定された。ステップ2は、60kDaキモトリブシンフラグメント中にPMI-1エピトープが存在しないことから、この部位がGP II b重鎖のアミノ末端側半分にあることを示している。さらに、ステップ3で、GP II bの残基1で始まる40kDa CNBrフラグメント中に架橋ペプチドが存在することからこのサブユニットのアミノ末端側3分の1に絞り込まれた。部位285または314のメチオニン残基は、この40kDaフラグメントのカルボキシ末端となりうる部位である。ステップ4は、この架橋部位を残基294から始まる7kDaのキモトリブシンフラグメントへの架橋部位を明確にした。この結果から放射性CNBr由来のフラグメントは285ではなく314で終わっており、K16架橋部位を21個の一連のアミノ酸内にあることが示された。ステップ5で、この架橋部位が残基253で始まる9kDaのSV8フラグメント内に存在することが確認された。このフラグメントは残基350付近で終わっていることが予測される。294-314領域がSV8フラグメント内に含まれることから、ステップ5は、ステップ4から説明されたK16架橋部位の特定に関する明確な証拠を提供している。

表1に示したガンマ鎖架橋部位を含むGP II bの一連の21残基の配列は、ボ

リペプチドp1と同じアミノ酸残基配列を有し、この配列はGP II bのフィブリノーゲン結合領域の一部を表している。

GP II b中のガンマ鎖架橋部位の配列をヒトの他のアルファサブユニットに関して決定された配列と整列させてみた。この整列を表1に示す。一次構造の高い保存性は明白である。GP II bのこの領域の配列類似性は、Mac-1のアルファサブユニットに関する48%からフィブリノーゲンセレブターVLA-5のアルファサブユニットに関する81%の範囲にあった。これら他のアルファサブユニットに対するGP II bの全体的類似性は22-38%である。このような構造の選択性は、レセプター機能におけるこの領域の役割には都合がよい。この保存性のために、ヒトのインテグリンのアルファサブユニット上のこの領域は、GP II bのフィブリノーゲン結合領域と“相同的”であると考えられる。それゆえ、本明細書ではこの領域をインテグリンのアルファサブユニットのリガンド結合領域と呼ぶ。

このリガンド結合領域が蛋白質分解フラグメントへの化学的架橋により同定される限り、リガンド結合部位の詳細な境界は約5から15アミノ酸残基ほどの誤差があると考えられる。従って、便宜上、この部位をアルファインテグリンサブユニット上の、ならびにGP II b-IIIa上の部位約290から約320の残基を含むリガンド結合領域と呼ぶことにする。

2. ポリペプチド合成

表2に示したインテグリンのアルファサブユニットの同定されたリガンド結合領域に対応するポリペプチドをモデル430自動ペプチド合成機(アブライドバイオシステムズ、フォスター・シティー、CA)に適合させたメリフィールド(Merrifield)等、Adv. Enzymol., 32: 221-96(1969)の古典的固相法で合成した。このポリペプチドをポリクローナルまたはモノクローナル抗体の調製を目的とした免疫化に使用するならば、各ポリペプチドのアミノ末端と付加的なトリペプチドCys-Gly-Gly(CGG)(表2には示していない)のカルボキシ末端残基のグリシンとが結合するようにポリペプチドを合成し、このポリペプチドとキャリヤー蛋白質とのチオール結合を可能とする。調製したポリペプチドレジンをフッ化水素で切断し、抽出後、ウ

・マータース・アソシエーツ(ミルフォード、MA)製の逆相C18カラムでのHPLCで純度を分析した。ポリペプチドp3-p9および表3に示したポリペプチドも同様の方法で合成した。

3. ポリペプチドによる血小板凝集の阻害

ヒトの血液60mlを最終濃度0.06ユニット/ミリリットル(U/ml)のヒルジン(シグマケミカル、セントリス、MO)を含むACD(0.065Mクエン酸、0.085Mクエン酸ナトリウム、2%デキストロース)5ml中に採取し、120×gで15分間遠心した。血小板濃縮血漿(PR P)と命名したこの上清を回収した。

200μlのPR PにBSAおよびデキストロース(各1mg/ml)を含むトロードバッファ190μl、1mM Ca²⁺、300mM フィブリノーゲン、および実施例2で調製したポリペプチドp1を、表4に示した種々の量で混合した。コントロールペプチドには、テストした30個のGP IIb-IIIaペプチドの代表物であるGP IIbの残基461-471を使用した。ついで、ADP(トローズバッファ中80μM)10μlを混合し血小板凝集を刺激した。この混合物を37℃に維持し、この間のこの混合物の透過率変化をデュアルサンブルアグリゲーションメーター(モデルDP-247E、シエンコ、モリソン、CO)でモニターした。

このアグリゲーションメーターは、200μl PR Pおよび200μlトローズバッファを含む溶液でコントロール凝集に関する5%およびポリペプチド存在化での凝集に関する10%の透過率のベースラインを設定して校正した。100%透過率の上限はすべて100ml PR Pおよび300μlトローズバッファの混合物を用いて設定した。

ポリペプチドp1により血小板凝集阻害を測定して得られた結果を表4に示す。この結果は、ADP混合後約3-4分の時点での測定したポリペプチド非存在下で得られる透過率(100%)に対する割合で示されている。表4の結果は、ポリペプチドp1が血小板凝集を投与量依存的に阻害することが示されている。

血小板が1mM Ca²⁺および300nMフィブリノーゲンを含む溶液内で凝集した時も同様の結果が得られた。さらに、1mM p1は、トロンビン(60

ミリユニット/ml)おコラーゲン(0.25g/ml)等の強力なアゴニストの存在下で凝集を部分的に阻害した(c.a. 40%)。

表4

ポリペプチドによる血小板凝集の阻害

ポリペプチド名	ポリペプチド濃度	透過率
コントロール	1mM	100
無し	0μM	100
p1	5.0μM	86
p1	50.0μM	67
p1	125.0μM	48
p1	1.25mM	10

上述の検定でポリペプチドp2をテストすると、検出可能だが低い血小板凝集阻害を示した。血小板凝集阻害に関してポリペプチドp2は、ポリペプチドp1よりも約80%効率が低い。

従って、この結果は、GP IIbのフィブリノーゲン結合領域由来の本発明のポリペプチドを用いた場合の血小板凝集および血栓形成などの血小板凝集に関する過程の阻害に有用な有効投与量を示している。

4. ポリクローナル抗血清の調製

最初に実施例2で調製した合成ポリペプチドをシステイン残基リンカーに存在するチオール残基を介してキーホール・リンベット・ヘモシアニン(KLH)に結合し、ポリペプチド-KLH結合体を形成した。まず、腹腔内注射により完全プロイントアジュバント中100μgの結合体でBalb/cマウスを免疫化し、ついで不完全プロイントアジュバントを用い皮下注射または腹腔内注射により二次免疫化した。

三回以上の二次免疫化の後、応答するマウスから血清を採取した。回収した血清には、免疫化したポリペプチドと免疫反応するポリクローナル抗体が含まれており、この血清は本発明の方法で使用するのに適している。

5. フィブリノーゲン結合の阻害

血小板のフィブリノーゲン結合に関するポリペプチドの阻害活性を¹²⁵I-フィブリノーゲンで試験した。¹²⁵I-フィブリノーゲン(60nM)をADP(10μM)で刺激した洗浄血小板に添加した。ポリペプチドp1、p1'の单一アミノ酸変異体(TDVNGEGRHDL=p1')およびコントロールペプチドの¹²⁵I-フィブリノーゲンに対する結合は、22℃、最終濃度1.0、0.5および0.05mMで測定した。結合したラジオラベル化フィブリノーゲンを定量し、ポリペプチド非存在下で結合するフィブリノーゲン量に対する割合で表した。表5に示したデータは、ADP刺激化血小板に添加する前に¹²⁵I-フィブリノーゲンをp1と30分間ブレインキュレーションし、10分後に結合を測定したデータである。この結果は、明らかにフィブリノーゲンの結合を阻害するp1残基配列の能力を示している。

表5

¹²⁵I-フィブリノーゲンの結合の阻害

ポリペプチド	濃度	阻害率(%)
p1	1.0mM	70
p1'	1.0mM	27
コントロール	1.0mM	2
p1	0.5mM	52
p1'	0.5mM	18
コントロール	0.5mM	2
p1	0.05mM	2
p1'	0.05mM	2
コントロール	0.05mM	2

コントロールペプチドには、GP IIb 24-33、363-374、430-439および530-544を使用した。

6. 固定化ポリペプチドに対するフィブリノーゲンの結合

ポリペプチドp1、p1'およびコントロールを96穴イムロン-2・マイクロプレート(ダイナテクラボラトリ、VA)に固定化した。ポリペプチドをブ

レートに入れ、4℃に24時間維持した後、このプレートをTween-20を含むペーストローズバッファ(pH 7.4)で洗浄した。このプレートを37℃で1時間、3%BSAでブレコートした後、再び洗浄した。¹²⁵I-フィブリノーゲン(50nM、50μl)を22℃、24時間かけてペプチドコートしたウェルに結合させ、つづいて十分に洗浄後結合した放射能を計数した。ラベル化フィブリノーゲンは非ラベル化フィブリノーゲンによって示すことが出来、それによって錯和結合量が分かる。

別の実験で、固定化したp1ポリペプチドへのフィブリノーゲンの結合の特異性を、固定化したp1に非ラベル化フィブリノーゲン、ウシ血清アルブミン(BSA)またはチログロブリンを¹²⁵I-フィブリノーゲン(50nM)と同時に曝すことにより検定した。この結果を表6に示す。

表6

固定化したペプチドに対する¹²⁵I-フィブリノーゲンの結合

固定化ポリペプチド 非ラベル化リガンド ¹²⁵I-フィブリノーゲン (cpm × 10⁻³)

p1	-	52
p1'	-	17
コントロール	-	6
p1	-	28
p1	0.2μMフィブリノーゲン	18
p1	0.4μMフィブリノーゲン	15
p1	0.8μMフィブリノーゲン	9
p1	1.2μMフィブリノーゲン	7
p1	1.6μMフィブリノーゲン	6
p1	1.2μM BSA	25
p1	1.5μM BSA	24
p1	1.2μMチログロブリン	23
p1	1.5μMチログロブリン	22

このように、フィブリノーゲンは、固定化したコントロールペプチドと比べ固定化したp1のはうによりよく結合し(10-12倍)、この結合はフィブリノーゲンに特異的である。

7. 固定化ポリペプチドp1に対するフィブリノーゲンの結合の阻害
固定化したp1に対するフィブリノーゲンの結合の阻害は、さきに表7に示した結果で検出された。つまり、特異的フィブリノーゲンの結合に比べ¹²⁵I-ラベルフィブリノーゲンの結合に関するアルブミンおよびチログロブリンの阻害は少ない。EDTA(5 mM)存在下での実験で、結合のカチオン依存性が確認された。フィブリノーゲンの二つのペプチド(HHLGGAKQAGDVおよびKYGGHHLGGAHQAGDV)は、固定化したp1とフィブリノーゲンとの相互作用を阻害した。また、このガムマ鎖領域に対するモノクローナル抗体(Matsuura等、FASEB J. 2: 6480(1988))は、この相互作用を阻害した。さらに、RGD含有ペプチド(RGD SおよびYVTAGRGDS PASSK)はフィブリノーゲンの結合を阻害する。これらの観測は、RGDガムマ鎖ペプチドがGP II b-III aの同部位と相互作用するという仮説と一致している。

表7

固定化p1ペプチドと¹²⁵I-フィブリノーゲンとの相互作用

インヒビター	濃度 (μM)	p1に対する ¹²⁵ I結合 フィブリノーゲンの結合 の阻害率(%)
無し		0
フィブリノーゲン	2	82±1.2
アルブミン	2	12±4
チログロブリン	2	14±4
EDTA	5000	90±8
HHLGGAKQAGDV	200	57±1.1
KYGGHHLGGAKQAGDV	200	54±1.2
RGDS	200	52±1.5
GRGESP	200	16±7
YVTAGRGDS PASSK	200	6.1±1.6
4A5 Mab	10	75±8
コントロールMab	10	15±4

8. 抗p1抗体はフィブリノーゲンの結合を阻害する。

GP II b-III aでウサギを免疫することによりGP II b-III aに対する抗体を調製した。このウサギの血清を固定化p1ペプチドを含むアフィニティカラム(2 mgペプチド/ml セファロース4B)に流し、結合した抗体を酸で溶出した(pH 2.5)。単離した抗p1抗体は1/1000の希釈率でp1と反応したが、1/10の希釈率でも他のGP II b-III aとは反応しなかった。

第7図に示したように、単離した抗p1抗体は、22°C、24時間かけてマイクロプレートに固定化したp1(黒丸)およびGP II b-III a(三角)への¹²⁵I-フィブリノーゲン(50 nM)の結合を濃度依存的に阻害した。コントロール抗体には、抗p1抗体に関して使用した方法を用いて生成したGP II b残基I

-I 3に対するものを使用した。抗p1プレートは上述のように調製し、また抗GP II b-III aプレートは、KYGRGDSを用いたアフィニティクロマトグラフィーで精製した10 μg/ml GP II b-III aでマイクロプレートのウェルをコーティングして調製した(ピテラ(Pytela)、R. 等、Science 231: 1559-62(1986))。

第7図Bは、血小板への¹²⁵I-フィブリノーゲンの結合に関する抗p1(B 12)抗体の効果を示している。¹²⁵I-フィブリノーゲン(60 nM)をADP刺激洗浄ヒト血小板(10⁴/ml)および抗体と22°Cで30分間インキュベートした。コントロール抗体には、GP II b-III aの別の領域に対するものを使用した。p1ポリペプチドに対する抗体は、血小板へのフィブリノーゲンの結合を特異的に阻害した。

特定の態様および実施例を含むこれまでに示してきた説明は本発明を説明するものであり、これを制限するものではない。本発明の真の精神および範囲を逸脱することなしに多くの変形および修正が可能である。

1	GATGCCAGAGCTTGTGTCACATGCCAAGCCCTCTGGCTTCTGGAGTG M A R A L C P L Q A L W L L E W	-16
49	GGTCTGCTGGCTCTTGGACCTTGTGGCTGCCCTCCAGCCCTGGCCTP V L L L G P C A A P P A W A L	1
97	GAACCTGGACCCAGTGAGCTCACCTTCTATGCAGGCCCAATGGCGAG N L D P V Q L T F Y A G P N G S	17
145	CCAGTTGGATTTCACTGGACTCCACAGGACGCCATGGAGCT Q F G F S L D F H K D S H G R V	11
193	GGCATCGTGGCCCCGGACCCCTGGGCCAGGGAGGA A I V V G A P R T L G P S Q E E	49
241	GACGGGGCGTGTCTGTGCCCTGGAGGGCCAGGGCCAGTG T G G V F L C P W R A E G G Q C	65
289	CCCTCTGGCTCTCTTGACCTCGTGTAGAACCGAAATGAGCT P S L L F D L R D E T R N V G S	81
337	CCAACCTTACAACCTTCAGGCCAGGACTGGGGCTGGTGGT Q T L Q T F K A R Q G L G A S V	97

FIG. 1-1

FIG. 1-4

1153	TGGCCGATTGGCTCTCCATCGCACCCCTGGGCACCTCGACCGGA G R F G S A I A P L G D L D R D	169
1201	TGGTACAATGACATTCAGCTGGCTGCCCTAACGGGTCTCCAGTGG G Y N D I A V A A P Y G G P S G	385
1249	CCGGGGCCAAGTGTCTGGGTAGAGTAGGGCTGAGGT R G Q V L V F L G Q S E G L R S	401
1297	ACGGCCCTCCAGGTCTGGACAGCCCCCTCCCAACGGCTTGCCCT R P S Q V L D S P F P T G S A F	417
1345	TGGCTTCTCCCTCGAGGTGGCTAGACATCGATGACAACGGATA G F S L R G A V D I D D N G Y P	433
1393	AGACCTGATCGTGGAGCTTACCGGGCCAACCAAGGGCTGTGTACAG D L I V G A Y G A N Q V A V Y R	449
1441	AGCTCAGCCAGTGTGTGAGGGCTTGTCAGCTACGGTGCAGATT A Q P V V K A S V Q L L V Q D S	465
1489	ACTGAATCCCTGCTGTGAGAGCTGTGTCCTACTCTCGACCAAGACACC L N P A V K S C V L P Q T K T P	481

FIG. 1-2

385	CGTCAGCTGGAGGCTCATTTGGCTCTGGCCCCCTGGCAGGACTG V S W S D V I V A C A P W Q H W	113
433	GAAGTCCCTAGAAAAGACTGGAGGTGAGAGAGGCCGTAGTAG N V L E K T E A E K T P V G S	129
481	CTGCTTGGCTCACCCAGAGGGCCGGCCGAGTACTCC C F L A Q P E S G R R A E Y S P	145
529	CTGTCGGGGAAACACCCCTGAGGCCATTACGTGGAAATGATTGTTAG C R G N T L S R I V V E N D F S	161
577	CTGGACAAGCTTACTGTGAGGGCTTACGCTGGGTGACTCA W D K R V C E A G F S S V V T Q	177
625	GGCGGAGAGCTGGCTCTGGGGCTCTGGGGCTATTATTCTCTAGG A G E L V L G A P G G Y V F L G	196
673	TCTCTGGCCAGGCTCAGTGGGATATTCTCGAGTTACCCCC L L A Q A P V A D I F S S Y R P	209
721	AGGCATCCCTTGTGGCACGTGTCCTCCAGAGCTCTGGCTC G I L L W H V S S Q S L S F D S	225

FIG. 1-5

1537	CGTAGGCTCTGAACATCCAGATCTGTGTGGAGCCACTGGGCC V S C F N I Q M C V G A T G H N	497
1585	CATTCCCTGAAGCTATCCCTAAATGCCGAGCTGGACGGCA I P Q K L S L N A E L Q L D R Q	513
1633	GAAGCCCGCCAGGGCCAGGGCTGGGTGCTGCTGGCTAACAGGC K P R Q G R R V L L G S Q Q A	529
1681	AGCACCAACCTTAACCTGGATCTGGCGGAAGACAGCCCCATCTG G T L N L D L G K H S P I C	545
1729	CCACACCATGGCTTGGATGAGATGGAGCACTCCGGACAA H T T M A F L R D E A D F R D K	561
1777	GCTGAGCCCCATTTGTGCTAACGTCTAACGGCCACGG L S P I V L S L N V S L P P T E	577
1825	GGCTGGATGGCCCTGGCTGCTGGCATGGAGAACCCATGTGCA A G M A P A V V L H G D T H V Q	593
1873	GGAGCACACGAATGCTGGACTCTGGGAAAGATGACGTATGT E Q T R I V L D S G E D D V C V	609

FIG. 1-3

769	CAGCAACCCAGAGTACTTCGACGGCTACTGGGTACTCGGGCC S N P E Y F D G Y W G Y S V A V	241
817	GGGCAGACTTCGACGGGATCTCACACTACAGAATATGTCGTGGTGC G E F D G D L N T T E Y V V G A	257
865	CCCACTTGGAGCTGGACCCCTGGAGGGTCAAATTGGGATTCCCTA P T W S W T L G A V E I L D S Y	273
913	CTACCAAGGGCTGGATGGCTGGCCAGAGCCAGATGGGTCTTATT Y Q R L H R L R G E Q M A S Y F	289
961	TGGGCAATTAGTCGCTCTGTACTGACCTCAAGGGGATGGGAGCTGA G H S V A V T D V N G D G R H D	305
1009	TCTGCTGGTGGGGCTCCACTGTATAAGGACAGCCGGCAGACGGAA L L V G A P L Y M E S R A D R K	321
1057	ACTGGCCGAGTGGGGCTGGTGTATTGTCTGGAGGGCGAGGG L A E V G R V Y L F L Q P R G P	337
1105	CCACGGCTGGGTGCCCTGGCTGACTGGCACACAGCTCA H A L G A P S L L T G T Q L Y	353

FIG. 1-8

2689	GCCGAGGAGCCCCCTCGAGGTTCAGGATCCAGTTCTCGTAAGCTGCGA P E Q P S R L Q D P V L V S C D	881
2737	CTCGGGCCCTGDACTGTTGCACTGCAGTGGCAGATGGCAGAGATGGCGG S A P C T V V Q C D L Q E M A R	897
2785	CGGGCAGGGGCCATGGTCAAGGTGCTGGCCTTCCTGTTGGCTGCCAG G Q R A M V T V L A F L W L P S	913
2833	CCTCTACAGAGGCCCTGGATCAGTTGGTGTGCACTGCACCCATG L Y Q R P L D Q F V L Q S H A W	929
2881	GTTCAAGGTGTCCCTCCCTCCCTATGGGTGCCCGCTCAAGCTGCC F N V S S L P Y A V P P L S L P	945
2929	CCGAGGGAAAGCTCAAGGTGGACACAGCTCTCGGGCCCTGGAGGA R G E A Q V W T Q L L R A L E E	961
2977	GAGGCCATTCCCATCTGGTGGGTCTGGTGGTGGTGGCT R A I P I W W V L V G V L G G L	977

FIG. 1-6

1921	GCCCCAGCTTCAGCTCACTGCCAGCGTGAAGGGCTCCCGCTCCCTAGT P Q L Q L T A S V T G S P L L V	625
1969	TGGGGAGATAATGCTCTGGAGCTGAGATGGACGCCAACGAGGG G A D N V L E L Q M D A A N E G	641
2017	CGAGGGGGCTPATGAAGGAGAGCTGGCTGGCACCTGCCAGGGCGC E G A Y E A E L A V H L P Q G A	657
2065	CCACTACATGCCGCCCTAAGCAATGTCGAGGGCTTGAGAGACTCAT H Y M R A L S N V E G F E R L I	673
2113	CTGTAATCAGAAGAGGAATGAGACCAGGGTGGCTGTGAGCT C N Q K K E N E T R V V L C E L	689
2161	GGGCAACCCCATGAAGAAGAACGCCAGATAGGATCGCGATGTGCT G N P M K K N A Q I G I A M L V	703
2209	GAGGGGGAAATCTGGAGGGTGGAGTCTGTCTCCAGET S V G N L E E A G E S V S F Q L	721
2257	GCAGATACGGAGCAAGAACAGCCAGATCCAACAGCAAGATTGTGCT Q I R S K N S Q N P N S K I V L	737

FIG. 1-7

2305	GCTGGAGCTGGGGTCCGGGAGAGGCCCAAGTGGAGCTGGAGGGAA L D V P V R A E A Q V E L R G N	753
2353	CTCCCTTCAGGCCCTGGAGCTGGCTGGAGAGGGTGGAGGGAA S F P A S L V V A A E E G E R E	769
2401	CGAGAACACGCTGGACAGCTGGGACCCAAAGTGGAGCACACCTATGA Q N S L D S W G P K V E H T Y E	785
2449	GCTGCCAACATGGGCTGGAGCTGGAATGGTCTCACCTCAAGCAT L H N N G P G T V N G L H L S I	801
2497	CCACCTTCGGGACAGTCCCAGCCCTCGGACCTGCTACATCCTGGA H L P G Q S Q P S D L L Y I L D	81
2545	TATACAGGCCCAAGGGGCCCTTCAGTGTCTTCCCACAGGCCCTCTCAA I Q P Q G G L Q C F P Q P P V N	833
2593	CCCTCTCAAGGTGGACTGGGGCTGGCCATCCCCAGGCCCTCCCAT P L K V D W G L P I P S P S P I	849
2641	TCACCCGGCCCATCACAAAGGGGATGGCAGACAGATCTCCGCCAGA H P A H H K R D R R Q I F L P E	865

FIG. 1-9

-17-

4

FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

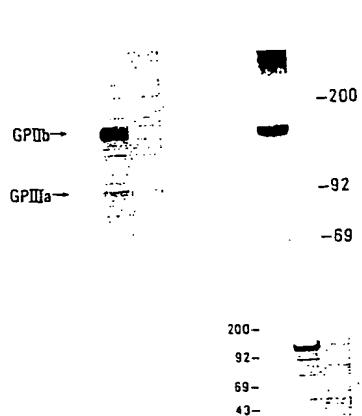


FIG. 3

1 2 3 4
イムノプロット オートラジオグラフ

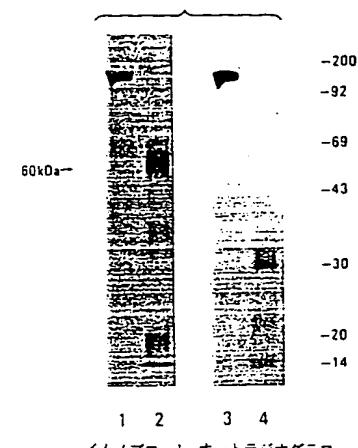
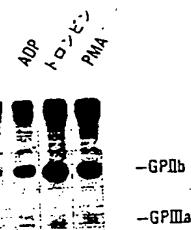


FIG. 6

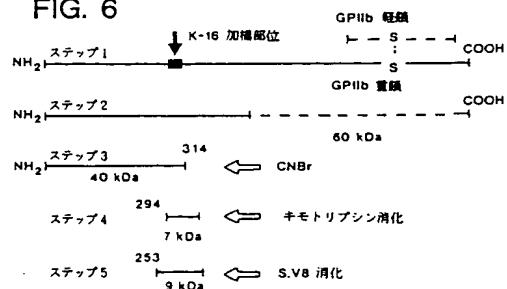
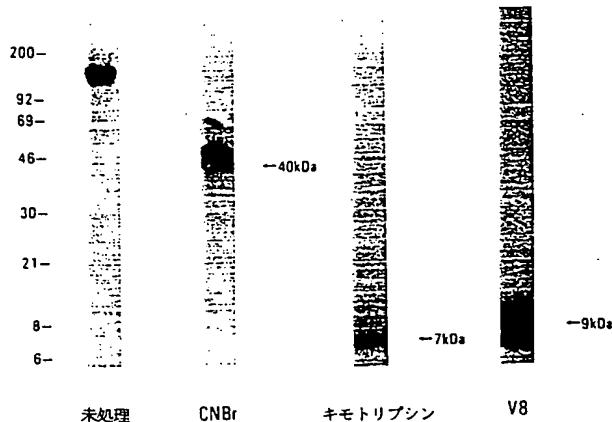


FIG. 5



CNBr: L N L D P V Q L T F Y A G P

294
キモトリプシン: A V T O V N253
V8: Y X V G A P T X X W T L G A V E

FIG. 7A

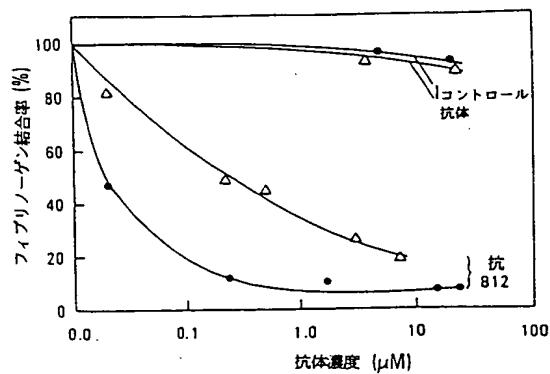
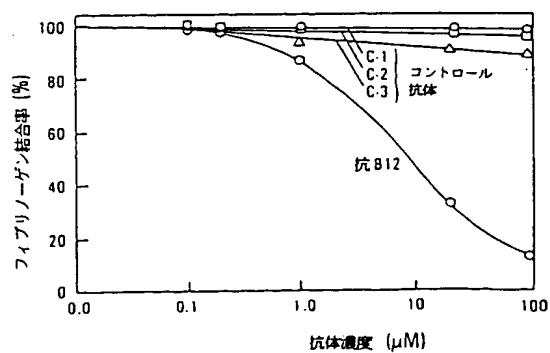


FIG. 7B



国際調査報告		PCT/US90/06954
I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER According to International Patent Classification (IPC) or to the Patent Classification of the World Intellectual Property Organization (WIPO) IPC5: A61K 37/00, 39/395; C07K 7/06, 7/10, 15/28; C12N 15/11 U.S. CL.: 530/326, 327, 328, 329, 330, 387; 424/85.8; 514/13, 14, 15, 16, 17, 18; 536/27		
II. FIELDS SEARCHED Documentary Searcher(s): Classification System: U.S. 530/326, 327, 328, 329, 330, 387; 424/85.8; 514/13, 14, 15, 16, 17, 18; 536/27		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT to the extent that such documents are included in the Patent Searcher(s)		
Automated Patent Search: Chemical Abstract Service		
IV. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Category Citation or Description Main independent, newly-claimed feature(s) or improvement(s) at the request of examiner Response to Claim No.		
X, P	Journal of Biological Chemistry, vol. 265 No. 6, issued 27 February 1990. D. Souza et al., "The Ligand Binding Site of the Platelet Integrin Receptor GPIIb-IIIA is Proximal to the Second Calcium Binding Domain of Its α subunit", pp. 3440-3446. See entire article, particularly Table I.	1-6, 12-14
Y	Journal of Biological Chemistry, vol. 262, no. 18, issued 25 June 1987. Puncz et al., "Structure of the Platelet Membrane Glycoprotein IIb" pp. 8476-8482. See Abstract and Fig. 2.	1-6, 12-14
<p>* Special categories of cited documents: - "A" document contains the general state of the art which is not explicitly disclosed in the patent document from which it is cited. "B" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "C" document is mentioned on the basis of understanding being given. "D" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "E" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "F" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "G" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "H" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "I" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "J" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "K" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "L" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "M" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "N" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "O" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "P" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "Q" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "R" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "S" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "T" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "U" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "V" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "W" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "X" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "Y" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. "Z" document contains information which cannot be considered as relevant to the patent application. </p>		
V. CERTIFICATION One of the Office Commissioners or the Commissioner of Patents 14 February 1991 11 MAR 1991 International Bureau Assistant ISA/US NINA OZAWA, PH.D.		

VI. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Documentary Searcher(s):		Document from the second sheet
Category	Citation or Description Main independent, newly-claimed feature(s) or improvement(s) at the request of examiner Response to Claim No.	
Y	Journal of Cell Biology, vol. 99, issued December 1984. Shadie et al., "Platelet-Collagen Adhesion: Inhibition by a Monoclonal antibody that Binds Glycoprotein IIb", pp. 2056-2060. See abstract.	4-6, 14 1-3, 12, 13
Y	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, issued September 1984. Nehra et al., "Efficient Mapping of protein antigenic determinants", pp. 7013-7017. See entire article.	1-3, 12, 13
Y	Cell, Vol. 48, issued 13 March 1987. Santoro et al., "Competition for Related but Nonidentical Binding Sites on the Glycoprotein IIb-IIIa complex by Peptides Derived from Platelet Adhesive Proteins", pages 867-873. See the entire document.	1-3, 12, 13

第1頁の続き

⑤Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
A 61 K 39/00 39/395	ADS H	8413-4C
C 07 K 7/06 7/10	ACB D	8413-4C
C 12 P 21/08	Z	8318-4H
G 01 N 33/53		8318-4H
// C 12 N 33/577	L	8214-4B
// C 12 N 5/20 15/06	D	8310-2J
(C 12 P 21/08	B	8310-2J
C 12 R 1:91)		9015-2J
C 07 K 99:00		

⑦発明者 デスーザ スタンリー イー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92126 サン デイエゴ フエンウェイク ロード 10721

⑦発明者 ギンズバーグ マーク エイチ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92122 サン デイエゴ レノールト ブレイス 2944